

Isoelektrische Fokussierung von Hühner-Serumproteinen in Agarosegelen

Rudi Nielazne

Disbui. München
1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554823_0099

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. U. Lösch

ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG VON HÜHNER-SERUMPROTEINEN
IN AGAROSEGELEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
RUDI NIELAZNE
aus
Püchersreuth

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. U. Lösch

Korreferent: Prof. Dr. Dr.habil. H. Gerlach

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Grundlagen der Mathematik	2
3.	Lineare Algebra	3
4.	Komplexe Zahlen	4
5.	Differentialrechnung	5
6.	Integralrechnung	6
7.	Lineare Differenzialgleichungen	7
8.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	8
9.	Lineare Algebra und Integralrechnung	9
10.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	10
11.	Lineare Algebra und Integralrechnung	11
12.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	12
13.	Lineare Algebra und Integralrechnung	13
14.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	14
15.	Lineare Algebra und Integralrechnung	15
16.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	16
17.	Lineare Algebra und Integralrechnung	17
18.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	18
19.	Lineare Algebra und Integralrechnung	19
20.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	20
21.	Lineare Algebra und Integralrechnung	21
22.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	22
23.	Lineare Algebra und Integralrechnung	23
24.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	24
25.	Lineare Algebra und Integralrechnung	25
26.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	26
27.	Lineare Algebra und Integralrechnung	27
28.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	28
29.	Lineare Algebra und Integralrechnung	29
30.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	30
31.	Lineare Algebra und Integralrechnung	31
32.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	32
33.	Lineare Algebra und Integralrechnung	33
34.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	34
35.	Lineare Algebra und Integralrechnung	35
36.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	36
37.	Lineare Algebra und Integralrechnung	37
38.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	38
39.	Lineare Algebra und Integralrechnung	39
40.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	40
41.	Lineare Algebra und Integralrechnung	41
42.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	42
43.	Lineare Algebra und Integralrechnung	43
44.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	44
45.	Lineare Algebra und Integralrechnung	45
46.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	46
47.	Lineare Algebra und Integralrechnung	47
48.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	48
49.	Lineare Algebra und Integralrechnung	49
50.	Lineare Algebra und Differentialrechnung	50

Für Gerti

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	6
2.1. Tiermaterial	6
2.2. Serum	7
2.3. Immunglobuline	7
2.4. Antiseren	7
2.5. Hämoglobin	8
2.6. Isoelektrische Fokussierung	8
2.6.1. Prinzip und Versuchsaufbau	8
2.6.2. Bestimmung des pH-Gradienten	10
2.6.3. Herstellung von Agarosegelen	11
2.6.4. Herstellung der Küvetten	11
2.6.5. Fokussierung	12
2.6.6. Anfärben der Proteinbanden	13
2.6.6.1. Coomassie-Färbung	13
2.6.6.2. Silber-Färbung	13
2.7. Densitometer	14
2.8. Diffusionsblotting: Transfer der Proteine vom Gel auf Nitrocellulosefolien	14
2.9. Immunofixation und Färbung	15
2.10. Silberfärbung der geblotteten Proteine	16
3. Ergebnisse	17
3.1. Isoelektrische Fokussierung von Proteinen aus dem Gesamtserum immunologisch intakter LSL-Hühner	17
3.1.1. Fokussierung mit unverdünntem Serum	17
3.1.2. Fokussierung mit verdünntem Serum	20
3.2. Isoelektrische Fokussierung von Proteinen aus dem Gesamtserum normogammaglobulin- ämischer UM-B19 Hühner	27
3.3. Isoelektrische Fokussierung von Proteinen aus dem Gesamtserum dysgammaglobulin- ämischer UM-B19 Hühner	33

3.4.	Isoelektrische Fokussierung von Proteinen aus dem Gesamtserum agammaglobulinämischer Hühner	38
3.5.	Isoelektrische Fokussierung von IgG	41
3.6.	Isoelektrische Fokussierung von IgM	42
3.7.	Isoelektrische Fokussierung von IgA	43
3.8.	Isoelektrische Fokussierung von Hämoglobin	44
3.9.	Immunologische Identifizierung von IgG nach Transfer auf Nitrocellulosefolie	45
3.10.	Immunologische Identifizierung von IgM nach Transfer auf Nitrocellulosefolie	48
3.11.	Immunologische Identifizierung von IgA nach Transfer auf Nitrocellulosefolie	50
3.12.	Unterscheidung immunologisch normaler und defekter Hühner durch Anwendung der Isoelektrischen Fokussierung	52
3.13.	Isoelektrische Fokussierung von Proteinen aus dem Gesamtserum 4 Wochen alter Hühner	57
4.	Diskussion	61
4.1.	Isoelektrische Fokussierung von Hühner- Serumproteinen	61
4.2.	Isoelektrische Fokussierung in Agarose- gelen	62
4.3.	Bandenmuster der Hühnergesamtseren	63
4.4.	Isoelektrische Fokussierung der Immun- globuline	64
4.5.	Isoelektrische Fokussierung von Hämoglobin	65
4.6.	Silberfärbung	66
4.7.	Diffusionsblotting und immunologischer Nachweis der Immunglobuline	68
5.	Zusammenfassung	71
6.	Summary	73
7.	Literatur	75

1. EINLEITUNG

Ausgehend von einem im Rahmen immunoelektrophoretischer Reihenuntersuchungen von Hühnerseren entdeckten Hahn, bei dem ein hochgradig verändertes immunoelektrophoretisches Serumeiweißbild mit Verstärkung der IgM- bei fehlender IgG-Präzipitationslinie aufgefallen war (BRÜGGEMANN et al., 1967), wurde am hiesigen Institut eine Zuchtlinie erstellt, bei der die erbliche Dysgammaglobulinämie des Huhnes (*Gallus domesticus*) gehäuft auftritt (LÖSCH, 1972; FIEDLER et al., 1980).

In einer Vielzahl von Arbeiten wurde diese Dysgammaglobulinämie und die damit zusammenhängenden Fragestellungen untersucht. Neben histologischen und immunhistochemischen Untersuchungsmethoden (HOFFMANN-FEZER et al., 1974; HOFFMANN-FEZER and LÖSCH, 1983), wurde vor allem mit den folgenden Analysetechniken gearbeitet:

- Einfache radiale Immundiffusion (FIEDLER et al., 1977, 1980, 1981; LÖSCH et al., 1981)
- Immunelektrophorese (MERKENSCHLAGER et al., 1966)
- Immundiffusion und Immunelektrophorese (BRÜGGEMANN et al., 1967, 1969, 1971; LÖSCH and HOFFMANN-FEZER, 1973; HOFFMANN-FEZER et al., 1974; LÖSCH et al., 1982)
- Immundiffusion, Immunelektrophorese und Sedimentationsanalyse (OBERDORFER and LÖSCH, 1970; HERLYN et al., 1977)
- Zweidimensionale Immunelektrophorese (LÖSCH et al., 1972; SCHRANNER et al., 1982)
- Radioimmunelektrophorese (LÖSCH et al., 1972)
- ELISA (UEBEL, 1984)
- SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese kombiniert mit zweidimensionaler Immunelektrophorese (SCHRANNER and LÖSCH, 1986)

In der vorliegenden Arbeit soll nun abgeklärt werden, inwieweit sich eine weitere Methode, nämlich die Isoelektrische Fokussierung, für die Klärung von Problemstellungen der oben erwähnten Art eignet. Dazu soll hier zunächst ein kurzer Abriß der Geschichte der Isoelektrischen Fokussierung wiedergegeben werden.

Als Beginn der Zeit der Isoelektrischen Auftrennungen ist wohl das Jahr 1912 zu nennen, als IKEDA und SUZUKI eine Methode zur Produktion von Natriumglutamat in einem Elektrolyseapparat beschrieben, der aus 3 Abteilungen bestand, welche durch Ionenpermeable Membranen getrennt waren. Modifikationen ihrer Trennkammer wurden später von vielen Forschern für die Trennung von Aminosäuren und anderen Ampholyten benutzt (FOSTER and SCHMIDT, 1926; COX et al., 1929; ALBANESE, 1940; THEORELL and ÅKESSON, 1941; SPERBER, 1946). Ein bedeutender Schritt vorwärts wurde durch WILLIAMS und WATERMAN (1929) getan, die die Zahl der Zwischenabteilungen auf 12 erhöhten und die ein klares Konzept entwickelten, um eine stufenweise Änderung des pH von einer Abteilung zur nächsten zu erhalten, mit einer stabilen pH-Verteilung und Ansammlung der Ampholyte an ihrem isoelektrischen Punkt (pI). Es sei hier ihr Verständnis von dem in ihrem Artikel beschriebenen Trennprozeß erwähnt: "Wenn die gesuchte Substanz ein Ampholyt ist, darf gefolgert werden, daß der pH von jenem Anteil der Lösung, der die Substanz in größter Konzentration enthält, dem pI der Substanz entspricht, da bei jedem pH größer oder kleiner als jenem des pI, die Substanz stärker als Base oder als Säure und umgekehrt ionisiert wird und deshalb zu dem Gebiet wandert, an dem die Ionisation als Base oder als Säure gleich ist, also dem Gebiet ihres pI." Dieses Prinzip wurde von DU VIGNEAUD et al. (1938) genutzt um Vasopressin und Oxytocin aus Hypophysenextrakt

zu isolieren. Als eine Variante dieses Multimembranenapparates benutzten WILLIAMS und TRUESDAIL (1931) Siphone um benachbarte Abteilungen zu verbinden, während WILLIAMS (1935) eine röhrenförmige Kammer baute, die in 61 Einzelsegmente unterteilt war. SPIES et al. (1941) konstruierten noch eine andere Version, die aus 6 Erlenmeyerkolben bestand, welche mit seitlichen, horizontalen Rohrstützen versehen waren. Diese Stützen machten es möglich die Kolben in Reihe zu schalten, so daß sie in gleicher Weise wie ein "Multicompartment electrolyzer" arbeiteten.

Ein weiterer wichtiger Beitrag kam von TISELIUS (1941) mit seiner Arbeit über die stationäre Elektrolyse von Ampholytlösungen. Er erkannte die Notwendigkeit des Zustandekommens einer stationären Konzentrationsverteilung von Elektrolyten und des Zustandekommens eines Gleichgewichts zwischen Elektromigration und Diffusion durch anhaltende Elektrolyse.

Erst in den Jahren 1954/55 wurden neue Erkenntnisse zur Methode der Isoelektrischen Fokussierung durch KOLIN (1954, 1955a,b, 1958, 1970) gemacht. Er hatte den Gedanken Ionen in einem kontinuierlichen pH-Gradienten zu fokussieren, welcher von einem Saccharose-Dichtegradienten konstant gehalten wird. Er gebrauchte den Ausdruck "isoelectric spectrum" um das Verteilungsmuster zu kennzeichnen, welches durch den Trennprozeß entstand. Der pH-Gradient wurde dadurch gebildet, daß die zu trennende Substanz in einem Tiseliusähnlichen Apparat auf die Schnittstelle zwischen sauren und basischen Puffer gebracht wurde und ihr Diffusion in einem elektrischen Feld ermöglicht wurde. In diesem pH-Gradienten konnte KOLIN "isoelectric line spectra" von Farbstoffen, Proteinen, Zellen und Mikroorganismen in einem Zeitraum von 40 Sekunden bis wenigen Minuten be-

obachten, einer auf dem Gebiet der Elektrophorese noch nicht erreichten Schnelligkeit. Gleichzeitig mit dem pH-Gradienten wirkten hier noch ein Dichtegradient, ein Elektrischer Leitfähigkeitsgradient und ein Temperaturgradient auf die Trennung ein.

KOLINs pH-Gradienten, beobachtet bei der Diffusion nichtamphoterischer Puffer von unterschiedlichem pH in einem elektrischen Feld, aber waren "artifizielle" pH-Gradienten, da ihr Gefälle sich ständig durch elektrische Wanderung und Diffusion der Pufferionen änderte. Die günstigsten Bedingungen wurden bei Verwendung von Pufferpaaren der selben Ionenarten beobachtet, wie der Verwendung von 2 Phosphatpuffern, deren Anfangs pH-Werte den pI-Wert der zu untersuchenden Substanz einschlossen. Von solchen Gradienten konnte nicht erwartet werden, daß sie mehr als eine Quasi-Gleichgewichtsposition der amphoterischen Moleküle erbrachten.

SVENSSONs (1961, 1962a,b) theoretische Arbeit zeigte dann die Mindestanforderungen für stabile pH-Gradienten in einem elektrischen Feld in dem Ausdruck "Trägerampholyt": Die in diesem System verwendeten Puffer müssen 2 fundamentale Eigenschaften haben, sie müssen amphoterisch sein und sie müssen Träger sein. Es kann also für die Isoelektrische Fokussierung nicht jeder Ampholyt verwendet werden, sondern nur der Trägerampholyt, daß heißt eine Mischung, die sowohl Strom "tragen" kann, als auch den pH. Mit diesen Ideen und mit VESTERBERGs (1969) eleganter Synthese solcher Ampholyte war die heutige Isoelektrische Fokussierung geboren.

Die beiden heute gebräuchlichsten Techniken sind die Isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamid- und in Agarosegelen (ALLEN et al., 1984). Die unabhängig voneinander von ROSEN et al. (1979a,b), ROSEN (1980) und

von SARAVIS et al. (1979, 1980a,b) und SARAVIS und ZAMCHECK (1979) beschriebene Methode der Fokussierung in Agarosegelen, weist folgende Vorteile gegenüber der Fokussierung in Polyacrylamidgelen auf (RIGHETTI, 1983):

- Agarose ist untoxisch, während Acrylamid und Bis Neurotoxine sind
- Agarosegele sind ohne Hilfe von Katalysatoren herzustellen, welche in Polyacrylamidgelen langlebige Radikale erzeugen können
- Agarose ist gut geeignet für nachfolgende Immunfixation
- Agarosegele haben einen Porendurchmesser bis zu 500 nm (RIGHETTI et al., 1981) und sind damit für Proteine mit einem Molekulargewicht bis zu 2 Millionen geeignet.

Aufgrund dieser Vorteile, soll in der vorliegenden Arbeit die Isoelektrische Fokussierung in Agarosegelen zur Charakterisierung des immunologischen Status von Hühnenserum unterschiedlicher Provenienz angewendet werden. Des weiteren sollen die Isoelektrischen Punkte der Immunglobuline und des Hämoglobins des Huhnes bestimmt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Tiermaterial

Die verwendeten Seren stammten von Hühnern beiderlei Geschlechts der folgenden Gruppen:

- a) Normogammaglobulinämische UM-B19 Hühner ("No") mit einem Serumimmunglobulinmuster, das fast der Norm entspricht, das heißt die IgG- und IgM-Konzentrationen sind normal, die IgA-Spiegel können leicht erhöht sein.
- b) Dysgammaglobulinämische UM-B19 Hühner ("Dys") mit verändertem Serumimmunglobulinmuster. Bei ihnen liegen erhöhte IgM- und IgA-Konzentrationen bei stark erniedrigten bzw. nicht mehr nachweisbaren IgG-Konzentrationen vor.

Die normo- und dysgammaglobulinämischen Tiere entstammen einer Hühnerlinie, die im hiesigen Institut herausgezüchtet wurde, und die bezüglich des Histokompatibilitätslocus homozygot ist (B19B19). Sie wurde "UM-B19 Linie" genannt, wobei "UM" für Universität München steht (FIEDLER et al., 1980).

- c) Immunologisch intakte Lohmann-Selected-Leghorn (=LSL) Hühner, die bei anderen Untersuchungen als Kontrolltiere dienten ("Ko").
- d) Agammaglobulinämische LSL-Hühner ("Bx") (SCHRANNER et al., 1982).

Dabei wurden Bruteier am 3. Embryonaltag in eine 2,5 %ige Testosteronpropionatlösung getaucht (GLICK and SADLER, 1961). An den ersten 4 Lebenstagen wurden insgesamt 8 mg Cyclophosphamid i.m. verabreicht (WEIDANZ et al., 1976).

Mit Hilfe der einfachen radialen Immundiffusion (MANCINI et al., 1965), der zweidimensionalen Immunelektrophorese (SCHRANNER et al., 1982) und mit

ELISA (ENGVAILL and PERLMANN, 1971) konnte im Serum weder IgG noch IgM oder IgA erfaßt werden. Nach MEYERS und QUALTIERE (1976) liegen die IgG- bzw. IgM-Werte nach dieser Behandlung bei weniger als 0,0001 mg/ml.

2.2. Serum

Das Blut wurde der Flügelvene entnommen, 45 Minuten bei 37°C inkubiert und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Das Serum wurde vom Blutkuchen durch Zentrifugieren bei 3000 U/min über 15 Minuten abgetrennt. Anschließend wurde das Serum eingefroren und bei -18°C aufbewahrt.

2.3. Immunglobuline

IgM und IgA wurde aus dem Serum dysgammaglobulinämischer Hühner, IgG aus dem Serum normogammaglobulinämischer Hühner isoliert. Isolierung und Reinigung von IgG, IgM und IgA wurde von Frau Dr. Schraner am hiesigen Institut durchgeführt (SCHRANNER et al., 1982).

2.4. Antiseren

Es standen folgende Antiseren zur Verfügung:

- a) Anti-IgG, Anti-IgM und Anti-IgA, am hiesigen Institut gewonnen aus Kaninchen nach den Methoden von MERKENSCHLAGER et al. (1966) und LÖSCH et al. (1981).
- b) Peroxidasekonjugiertes Anti-Kaninchen-IgG aus der Ziege (Firma Paesel).

2.5. Hämoglobin

Zur Gewinnung von Hämoglobin wird 1 ml heparinisiertes Blut dreimal mit 10 ml 0,15M NaCl-Lösung gewaschen. Nach Zentrifugieren und Verwerfen der Plasma-NaCl-Fraktion, werden die Erythrozyten mit 4,2 ml H₂O dest. hämolysiert. Es wird 0,7 ml Tetrachlorkohlenstoff zugefügt, gemischt und zentrifugiert (MOO-PENN and SCHMIDT, 1977).

2.6. Isoelektrische Fokussierung

2.6.1. Prinzip und Versuchsaufbau

Das Prinzip der isoelektrischen Fokussierung ist die Anwendung der Elektrophorese im pH-Gradienten. Dieser wird bei den von uns verwendeten Ampholyten (LKB) aus einem Gemisch von aliphatischen Polyamino-Polycarboxylsäuren aufgebaut (RIGHETTI, 1983). Eine repräsentative Strukturformel hat folgendes Aussehen:

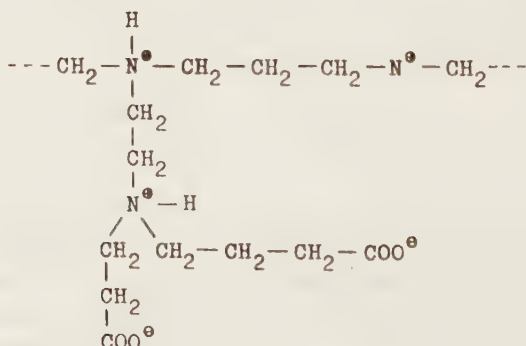


Abb. 1: Repräsentative Strukturformel von Ampholyten

Wird nun über die Gellänge eine Spannung angelegt, wandern diese im Gemisch geladenen Trägerampholyte entsprechend ihrer Ladung zur Anode bzw. Kathode, bis sie an ihrem isoelektrischen Punkt die Ladung 0 haben. Würde ein Ampholyt über diesen Punkt hinaus weiterwandern, bekäme er die entgegengesetzte Ladung wie vorher und würde im elektrischen Feld wieder zu diesem Punkt zurückwandern. Da er hier keine Ladung hat, ist er am isoelektrischen Punkt auch unbeeinflusst vom elektrischen Feld. Da diese Trägerampholyte eine hohe Pufferkapazität haben, hat ihre Umgebung den pH-Wert ihres isoelektrischen Punktes.

Gibt man nun ein Proteingemisch auf, wandert das einzelne Proteinmolekül aufgrund seiner Ladung bis zu dem Punkt, der den gleichen pH-Wert hat wie sein isoelektrischer Punkt. Moleküle mit gleichem isoelektrischen Punkt konzentrieren ("fokussieren") sich an dieser Stelle. So erhält man in dem sich ergebenden Eiweißmuster scharfe Banden, die am gleichen Punkt stehen bleiben und gut reproduzierbar sind. Durch spezielle Anfärbemethoden oder Enzymreaktionen, die durch gekoppelte Farbreaktionen sichtbar gemacht werden, kann man Unterschiede zwischen den einzelnen Proben beobachten und Aufschlüsse über die Verteilung von Proteinen erhalten.

Die Fokussierung wurde ausgeführt auf der Flachgelkammer "LKB 2117 Multiphor II", deren Kühlblock mittels Leitungswasser so gekühlt wurde, daß im zu fokussierenden Gel eine Temperatur von 10°C herrschte.

Zur Stromversorgung der Fokussierungskammer wurde das Netzgerät "LKB 2103" verwendet. Die richtige Begrenzung der Spannung und der Leistung ist sehr wichtig, da bei zu hoher Leistung zuviel Joulesche Wärme entsteht, und es dabei zu örtlichen Überhitzungen kommt, die die

Trennung stören können. Ist die Spannung und die Leistung zu niedrig, wird die Trennung nicht scharf genug, und sie dauert zu lange. Bei der vorliegenden Arbeit wurden folgende Begrenzungswerte eingestellt:

Leistung	12 W
Spannung	1500 V
Stromstärke	30 mA

2.6.2. Bestimmung des pH-Gradienten

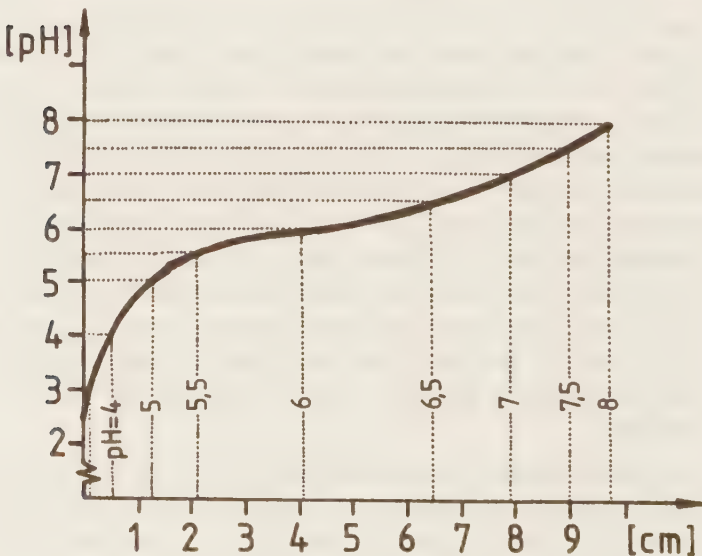


Abb. 2: pH-Gradientenverlauf

Die Messung des pH-Gradienten erfolgte mit Hilfe von Oberflächenelektroden (LKB Multiphor-Electrode 2117-111) in 5 mm-Abständen über den pH-Gradienten des Gels. In Abbildung 2 wurden die gemessenen Werte über der Länge

des Gradienten aufgetragen. In dieser Abbildung wurden dann die ganzzahligen pH-Werte anhand der sich ergebenden Kurve auf die Gradientenlänge projiziert. Da sich bei verschiedenen Trennungsläufen, die alle unter denselben Bedingungen erfolgten, nur unwesentlich verschiedene pH-Gradientenverläufe ergaben, wurde diese Einteilung für alle Proteinphorogramme verwendet.

2.6.3. Herstellung von Agarosegelen

(modifiziert nach COOK and SARAVIS, 1979; ROSEN et al., 1979a; ALLEN et al., 1984; RIGHETTI, 1983)

Für 2 Gele der Größe 250x110x0,6 mm werden 3,5 g Sorbit (Merck) und 0,35 g Agarose IEF (Pharmacia) mit H₂O dest. auf 32,8 ml aufgefüllt und unter Rühren im kochenden Wasserbad gelöst.

Nach Abkühlen der Lösung auf unter 75°C werden folgende Mengen von LKB Ampholyten zugefügt:

0,52 ml pH 2,5-4,5
0,7 ml pH 4,0-6,5
1,05 ml pH 5,0-8,0

Nach kurzem Rühren wird die Lösung mit einer Pipette in die auf 50°C erwärmten Küvetten abgefüllt.

Die fertigen Gele werden bis zum Gebrauch, in den Küvetten belassen, im Kühlschrank aufbewahrt.

2.6.4. Herstellung der Küvetten

(COOK and SARAVIS, 1979; GÖRG et al., 1977)

Um ein Gel von der Fläche 250x110 mm herzustellen wird auf eine rechteckige Glasplatte (265x125 mm) ein, die Glasplatte auf allen Seiten etwas überragendes, Stück

Gelbondfilm (FMC Corporation, Marine Colloids Division, Bio Products; Rockland) luftblasenfrei aufgewalzt. Einige Wassertropfen unter der Trägerfolie erzeugen engen Kontakt zwischen Folie und Glasplatte. Es ist darauf zu achten, daß die hydrophile Seite der Trägerfolie der Glasplatte abgewandt ist. Auf die Trägerfolie wird eine 7,5 mm breite, aus 5 Schichten Parafilm "M" (American Can Company) geschnittene Dichtung aufgelegt, was eine Geldicke von 0,6 mm ergibt. Darauf wird wiederum eine Glasplatte (265x125 mm) gelegt und die Küvette durch Anlegen von Klammern (System LKB) abgedichtet.

2.6.5. Fokussierung

Die Agarosegele werden erst kurz vor Fokussierungsbeginn aus der Küvette entnommen. Man entfernt die Klammern und hebt mit einem Spatel vorsichtig die obere, nicht der Trägerfolie anliegende, Glasplatte ab.

Eventuell der Trägerfolie anhaftende Wassertropfen werden mit einem Papiertuch abgesaugt und die Folienüberstände der Schmalseiten werden mit einer Schere am Gelrand abgeschnitten. Anschließend wird das Gel mit der Folie nach unten auf den Kühlblock des Fokussierungsapparates gelegt. Der Kühlblock wird zuvor mit reichlich Kerosin als Kontaktflüssigkeit beschichtet.

Als Elektrodenlösungen wurden für die Kathode 0,5M NaOH und für die Anode 0,5M Essigsäure verwendet. Die Elektrodenstreifen (LKB) wurden in die jeweilige Lösung eingetaucht und auf das Gel gelegt. Eventuelle Überstände der Streifen wurden auf Gellänge zugeschnitten.

Die Probeaufgabe erfolgte unter Verwendung von 10x5 mm großen Probeaufgabestücken (LKB). Diese wurden mit der Pinzette in 2 cm Abstand von der Anode auf das Gel ge-

legt. Mit einer Pipette wurden die Proben auf die Probenaufgabestücke gegeben. Die Auftragsmenge betrug 0,015 ml.

Es wurde 2 Stunden mit den unter 2.6.1. beschriebenen Spannungs-, Strom- und Leistungswerten fokussiert. Nach 1 Stunde wurde die Fokussierung kurz unterbrochen, um die Probeaufgabestücke abzunehmen.

2.6.6. Anfärben der Proteinbanden

Das Gel wurde nach Fokussierungsende sofort in eine wässrige Fixierlösung mit 10 % Trichloressigsäure und 1 % Sulfosalicylsäure gelegt. Nach 10 min wurde es zweimal, insgesamt 10 min lang mit Äthanol gewaschen und anschließend im warmen Luftstrom getrocknet.

2.6.6.1. Coomassie-Färbung

Das getrocknete Gel wurde für 20 min in eine Lösung von 0,5 % Coomassie Brilliant Blue R-250 in Äthanol-Essigsäure-Wasser (35:10:55) gelegt. Danach wurde solange mit Äthanol-Essigsäure-Wasser (35:10:55) entfärbt, bis die Lösung nicht mehr blau war. Anschließend wurde das Gel erneut im warmen Luftstrom getrocknet.

2.6.6.2. Silber-Färbung

(modifiziert nach WILLOUGHBY and LAMBERT, 1983;
VESTERBERG and GRAMSTRUP-CHRISTENSEN, 1984;
BLACK, 1985)

Es wurden 2 Lösungen hergestellt:

Lösung I enthält 5 % Natriumcarbonat

Lösung II enthält 0,2 % Ammoniumnitrat, 0,2 % Silbernitrat, 1 % Wolframatokieselsäure und 0,52 % Formaldehyd.

68 ml Lösung II wurden zu 32 ml stark gerührter Lösung I gegeben und sofort über das fixierte, gewaschene und getrocknete Gel gegossen. Unter leichtem Schütteln wurde das Gel solange gefärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar, der Hintergrund aber noch nicht zu dunkel gefärbt war. Die Färbung wurde gestoppt, indem das Gel für 5 min in 1 %ige Essigsäure gelegt wurde. Anschließend wurde das Gel 5 min in H_2O dest. gewaschen und dann im warmen Luftstrom getrocknet. Die Silberfärbung kann auch mit Coomassiegefärbten, getrockneten Gelen erfolgen.

2.7. Densitometer

Die gefärbten Proteinphorogramme wurden mit dem "Ultra Scan Laser Densitometer" (LKB) densitometrisch vermessen.

2.8. Diffusionsblotting:

Transfer der Proteine vom Gel auf Nitrocellulosefolien.

(modifiziert nach SOUTHERN, 1975; BOWEN et al., 1980; HOFFMAN and JUMP, 1985)

15 min vor Beendigung der Fokussierung wurde ein Blatt Nitrocellulose BA85 (Schleicher&Schüll), das auf geeignete Größe zugeschnitten wurde, in H_2O dest. gelegt. Nach Beendigung der Fokussierung und Entfernung der Elektrodenstreifen, wurde das Gel kurz in H_2O dest. gewaschen, überschüssiges Wasser ließ man ablaufen und bei Bedarf wurde es mit Papiertüchern vorsichtig drainiert. Die angefeuchtete Nitrocellulosefolie wurde aus

dem Wasser genommen, überschüssiges Wasser ließ man abtropfen. Danach wurde die Nitrocellulosefolie auf die Oberfläche des fokussierten Gels gelegt. Dabei ist darauf zu achten, daß keine Luftblasen zwischen Gel und Nitrocellulosefolie eingeschlossen sind; desgleichen sollte die Nitrocellulosefolie ohne Verrutschen aufgelegt werden. Die Nitrocellulosefolie wurde mit einem Blatt Filterpapier Whatman Nr.1 bedeckt. Darauf wurden 10 Papierhandtücher gelegt. Eine Glasplatte und ein Gewicht von 20 g/cm^2 Blottingfläche bildeten den Abschluß des Blottingensemble.

Nach 1 Stunde wurde die Nitrocellulosefolie von der Geloberfläche abgezogen.

2.9. Immunofixation und Färbung

Nach dem Blotten wurde die Nitrocellulosefolie zum Blockieren der freien Bindungsstellen für 1 Stunde in TBS (50mM Tris, 200mM NaCl, pH 7,4) mit 3 % Gelatine gelegt.

Danach erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper (aus Kaninchen), der 1:100 in TBS+1 % Gelatine verdünnt wurde.

Nach 1 Stunde wurde die Nitrocellulosefolie kurz in H_2O dest. gespült und danach 3 mal je 5 min mit 0,05 % Tween 20 gewaschen.

Hierauf erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidasegekoppelten Anti-Kaninchen-IgG (aus Ziege), das 1:1000 in TBS+1 % Gelatine verdünnt wurde (Fa. Paesel).

Nach 1 Stunde wurde die Nitrocellulosefolie wieder kurz in H_2O dest. gespült und 3 mal je 5 min in TBS mit 0,05 % Tween 20 gewaschen.

Für die Färbung wurden 60 mg 4-Chloro-1-Naphthol in 20 ml Methanol mit 0,04 ml 30 %igem H_2O_2 in 100 ml TBS

(frisch bereitet) gemischt (HAWKES et al., 1982).

2.10. Silberfärbung der geblotteten Proteine

Die Nitrocellulosefolie wird nach dem Blotten mit der unter 2.6.6.2. beschriebenen Methode gefärbt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Isoelektrische Fokussierung von Proteinen aus dem Gesamtserum immunologisch intakter LSL-Hühner

3.1.1. Fokussierung mit unverdünntem Serum

Abbildung 3 gibt das Pherogramm von 13 verschiedenen LSL-Hühnerseren beiderlei Geschlechts wieder. Das Alter der Tiere betrug 4 bzw. 6 Monate.

RIETSCHER et al. (1976) geben als Gesamtproteingehalt im Plasma 62,4 g/l an (Alter unbekannt), SCHELLNER (1971) bei 28 Wochen alten weiblichen Leghorns $56,0 \pm 4,7$ g/l, BANERJEE und BANDYOPADHYAY (1975) bei weiblichen Leghorns $47,0 \pm 1,0$ g/l und KÄHLKE (1961) bei erwachsenen weiblichen Leghorns $45,4 \pm 9,2$ g/l.

Geht man von einem mittleren Serumproteingehalt von 50 g/l aus, so bedeutet dies, bei Auftrag von 0,015 ml unverdünntem Serum, eine Proteinauftragsmenge von 0,75 mg.

Die einzelnen Proben wurden mit "Ko" gekennzeichnet.

Die Abbildungen 6.1 bis 6.13 zeigen zur Verdeutlichung der Ergebnisse die aufgezeichneten Densitogramme des Gels.

Die für die Probendifferenzierung und zur rascheren Orientierung wichtigen Banden wurden mit den Buchstaben a bis m bezeichnet.

Der pH-Gradient wurde sowohl beim Pherogramm, als auch bei den Densitogrammen als Gerade gezeichnet.



Abb. 3: Proteinphorogramm unverdünnter Sera von immuno-
logisch intakten LSL-Hühnern (=Kontrollhühner; Ko)
nach Coomassiefärbung
(m=Monat)

Bei den untersuchten LSI-Seren können im Proteinphorogramm mindestens 47 Banden unterschieden werden, die im pH-Bereich 2,8-8,0 liegen.

Auffällig sind die starken Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben im pH-Bereich 7-8. Die in diesem Bereich zu findenden Banden sind, wie bei 3.8. gezeigt, die Proteinbanden des Hämoglobins.

Die unterschiedlichen Hämoglobingehalte erklären sich dadurch, daß das verwendete Serum ursprünglich für andere Versuche vorgesehen war, bei denen eine mögliche, bei der Serumgewinnung stattgefundene Hämolyse ohne Belang war.

Bei längerer Lagerung der Proben in aufgetautem Zustand, findet, wie bei 3.8. gezeigt, eine Denaturierung des Hämoglobins statt, was sich bei erneuter Fokussierung zu einem späteren Zeitpunkt in einer Reduzierung der Hämoglobinbanden äußert.

Im stark sauren Bereich treten Verzerrungen des pH-Gradienten auf. Diese Verzerrungen sind durch den relativ extremen pH-Bereich bedingt. Wurde bei der Ampholytmischung ein größerer Anteil der Ampholyte 2,5-4,5, als bei 2.6.3. beschrieben verwendet, betrafen die Verzerrungen den pH-Gradienten des gesamten Gels.

Im Bereich unterhalb pH 7,0 sind deutlich einheitliche, sich bei jeder Probe fokussierende Banden zu finden (a bis m).

Augenfällig ist, daß sich der mengenmäßig stark überwiegende Proteinanteil im pH-Bereich 4,5-6,0 fokussiert.

Betrachtet man den pH-Bereich 5,5-7,0, sind Intensitätsunterschiede der Bandenspektren auffällig. Bei einer subjektiven Einteilung in 3 Intensitätsstufen erhält man folgende Verteilung:

- 1) Starke Intensität: Ko1♀4m, Ko4♀6m, Ko5♀4m,
Ko6♀4m, Ko9♂6m
- 2) Mittlere Intensität: Ko2♀6m, Ko5♂6m, Ko7♀6m
- 3) Schwache Intensität: Ko1♂6m, Ko3♀4m, Ko3♂6m,
Ko6♂6m, Ko7♂4m

Es ist auffällig, daß die Hennenserren in der Mehrzahl in der starken Intensitätsstufe zu finden sind, die Hähneseren dagegen in ihrer Mehrzahl in der schwachen Intensitätsstufe. Dies würde mit den Ergebnissen von OBERDORFER (1970) übereinstimmen, der geschlechtsspezifische Unterschiede des Serumproteinmusters und der Gesamtproteinkonzentration feststellte (♀♀: 47,8 g/l; ♂♂: 44,9 g/l).

In den Densitogrammen wird dieser Intensitätsunterschied besonders deutlich, wenn man die Kurvenintegrale im pH-Bereich 6,1-7,0 betrachtet. Anhand der Integrale in diesem pH-Bereich kann die subjektiv getroffene Intensitätseinteilung objektiviert werden.

Wie beim Pherogramm blieben bei den Densitogrammen die Hämoglobinbanden im pH-Bereich 7,0-8,0 ohne Bezeichnung.

3.1.2. Fokussierung mit verdünntem Serum

Abbildung 4 zeigt das Pherogramm der im Verhältnis 1:5 mit H₂O dest. verdünnten LSL-Seren nach Coomassiefärbung. Diese Verdünnung ergibt bei einem Probenauftrag von 0,015 ml und einem angenommenen Gesamtserumprotein-gehalt von 50 g/l eine Proteinauftragsmenge von 0,15 mg.

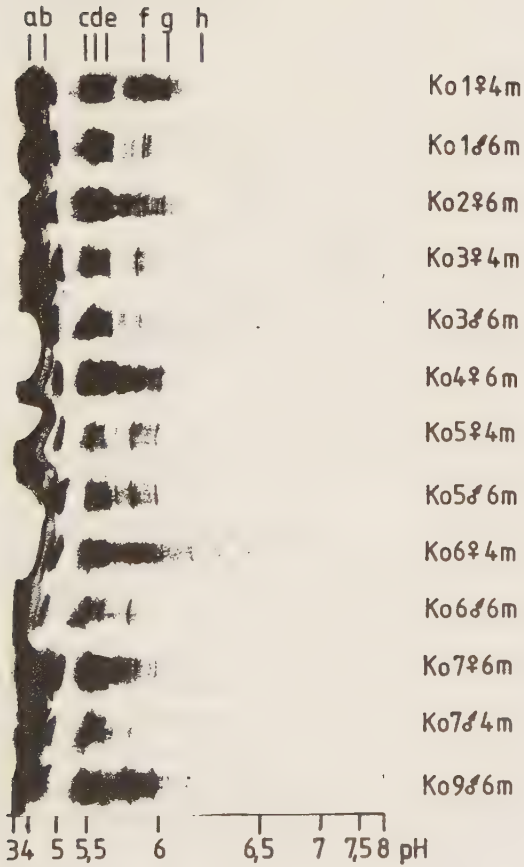


Abb. 4: Proteinphorogramm verdünnter Sera von immuno-
logisch intakten LSL-Hühnern (=Kontrollhühner; Ko)
nach Coomassiefärbung
(m=Monat)

Es ist augenfällig, daß auch bei diesem Pherogramm die pH-Gradientenverzerrung im sauren Bereich zu finden ist. Es ist also ersichtlich, daß diese Verzerrung nicht durch eine zu große Proteinauftragsmenge verursacht wird.

Bei der Verwendung der verdünnten Seren sind deutlich weniger Banden zu unterscheiden, als bei den unverdünnten Seren, wobei die einzelnen Banden zum Teil auch eine sehr geringe Intensität haben.

Die Intensitätsunterschiede der Bandenspektren lassen sich aber auch hier feststellen, wobei die im vorhergehenden Kapitel getroffene Einteilung in 3 Intensitätsstufen bestätigt wird.

Abbildung 5 zeigt das Pherogramm der im Verhältnis 1:5 verdünnten LSL-Seren nach Silberfärbung wie in 2.6.6.2. beschrieben.

Es ist hier eine deutlich bessere Anfärbung der einzelnen Banden, als beim vergleichbaren Coomassiegefärbten Gel festzustellen.

Allerdings muß festgehalten werden, daß mit der Silberfärbung, im Vergleich zur Coomassiefärbung, nicht alle Proteinbanden gleich stark verstärkt werden.

Sehr gut verstärkt werden mit der Silberfärbung die Banden des Hämoglobins und die Banden im pH-Bereich unterhalb pH 6,0. Dagegen ist im pH-Bereich über pH 6,0 mit Ausnahme der erwähnten Hämoglobinbanden eine geringere Bandenverstärkung zu beobachten.

Dieser Umstand führt dazu, daß die bei den Pherogrammen der Coomassiegefärbten Gele festgestellten Intensitätsunterschiede zwischen den einzelnen Seren, beim Silbergefärbten Gel nicht in dieser Deutlichkeit zu finden sind.

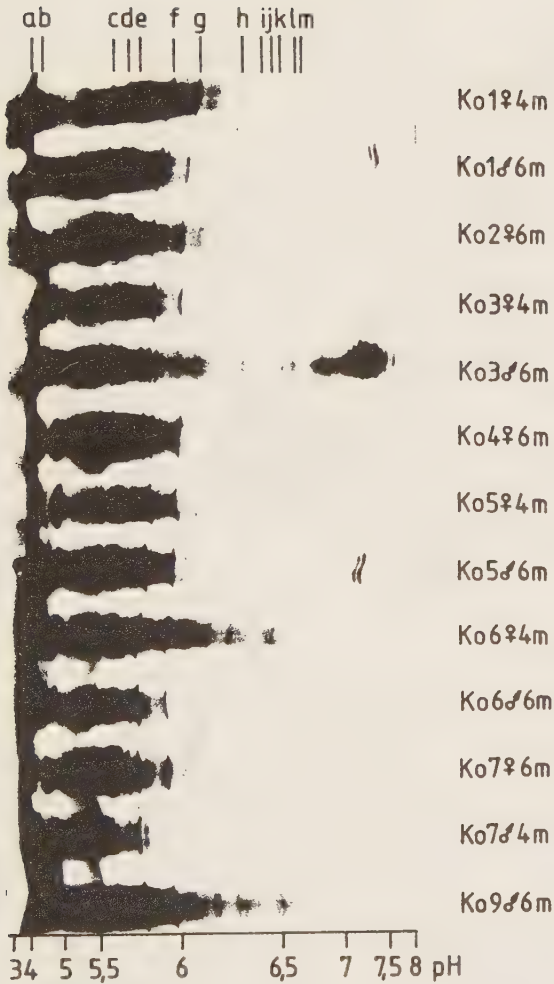


Abb. 5: Proteinphorogramm verdünnter Sera von immunologisch intakten LSL-Hühnern (=Kontrollhühner; Ko) nach Silberfärbung (vergl. Abb. 4) (m=Monat)

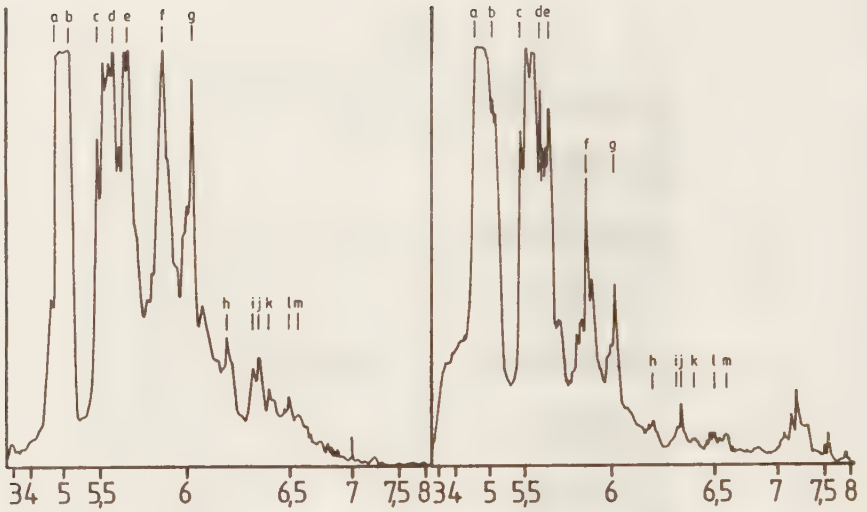


Abb. 6.1: Densitogramm
Ko124m

Abb. 6.2: Densitogramm
Ko106m

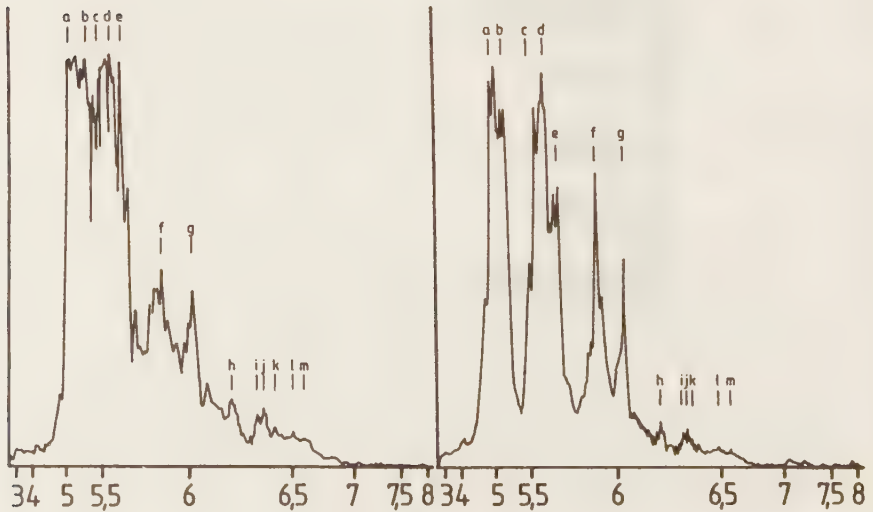


Abb. 6.3: Densitogramm
Ko226m

Abb. 6.4: Densitogramm
Ko324m

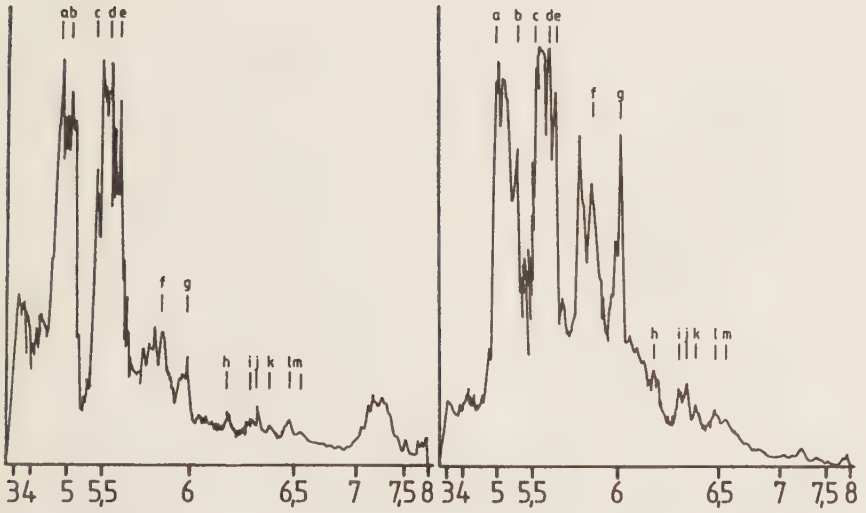


Abb. 6.5: Densitogramm
Ko306m

Abb. 6.6: Densitogramm
Ko496m

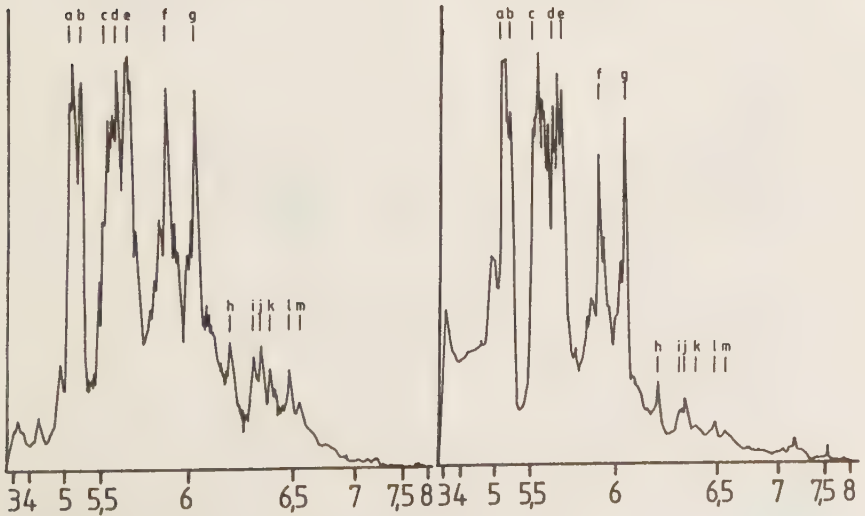


Abb. 6.7: Densitogramm
Ko594m

Abb. 6.8: Densitogramm
Ko506m

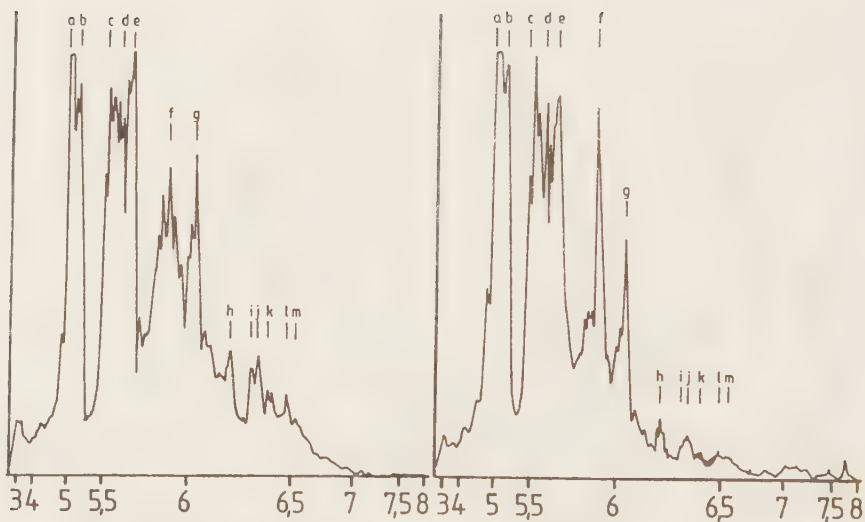


Abb. 6.9: Densitogramm
Ko694m

Abb. 6.10: Densitogramm
Ko606m

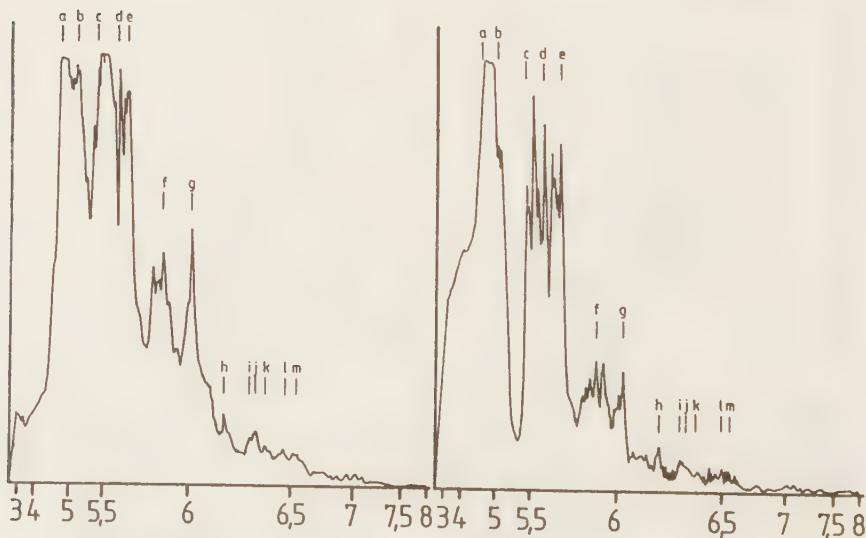


Abb. 6.11: Densitogramm
Ko796m

Abb. 6.12: Densitogramm
Ko704m

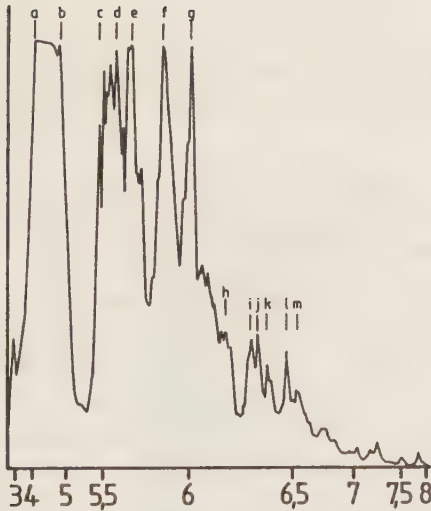


Abb. 6.13: Densitogramm
Ko966m

3.2. Isoelektrische Fokussierung von Proteinen aus dem Gesamtserum normogammaglobulinämischer UM-B19 Hühner

Abbildung 7 zeigt das Pherogramm 11 verschiedener normogammaglobulinämischer UM-B19 Hühnersera beiderlei Geschlechts. Das Alter der Tiere betrug 4 bzw. 6 Monate. Die Serumproben wurden unverdünnt aufgetragen. Die einzelnen Proben wurden mit "No" gekennzeichnet.

Die zu diesem Pherogramm gehörigen Densitogramme sind in den Abbildungen 8.1 bis 8.11 zu finden.

Es können bei den einzelnen Proben wie bei den LSL-Seren mehr als 40 Banden unterschieden werden.

Bei No1825⁹4m, No1893⁹4m und No2098⁶6m sind im alkalischen Bereich wieder deutliche Hämoglobinbeimengungen festzustellen.

Das Bandenmuster der normogammaglobulinämischen Seren stimmt, wie bei 3.12. in Abbildung 20 nochmals verdeutlicht, mit demjenigen der LSL-Seren überein.

Sehr auffällig ist die stark verminderte Bandenintensität von No1826⁹4m und No2058⁹4m im pH-Bereich 5,5-7,0. Ein Vergleich mit Abbildung 9 zeigt, daß es sich bei diesen beiden Proben in Wahrheit um dysgammaglobulinämische Seren handeln muß, die irrtümlich als normogammaglobulinämisch eingestuft worden waren. Objektiviert wird die Behauptung, daß es sich bei No1826⁹4m und No2058⁹4m um dysgammaglobulinämische Seren handelt, durch den Vergleich der Integrale ihrer Densitogramme (Abb. 8.3 und Abb. 8.10) im pH-Bereich 6,1-7,0. Diese sind im Vergleich zu den Integralen der anderen Proben sehr klein.

No2021⁶4m und No2037⁶4m weisen gegenüber den restlichen 7 Proben eine etwas verminderte Bandenintensität im Bereich pH 5,5-7,0 auf.

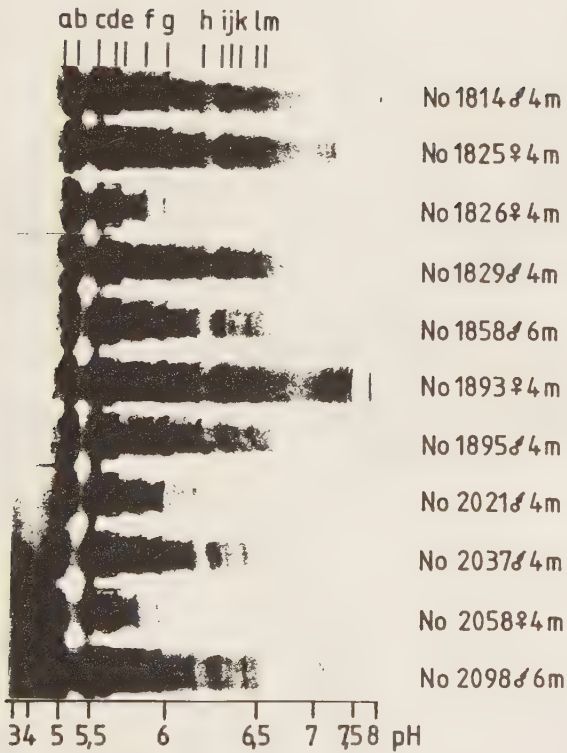


Abb. 7: Proteinphorogramm unverdünnter Sera von normo-
gammaglobulinämischen UM-B19 Hühnern (=No)
nach Coomassiefärbung
(m=Monat)

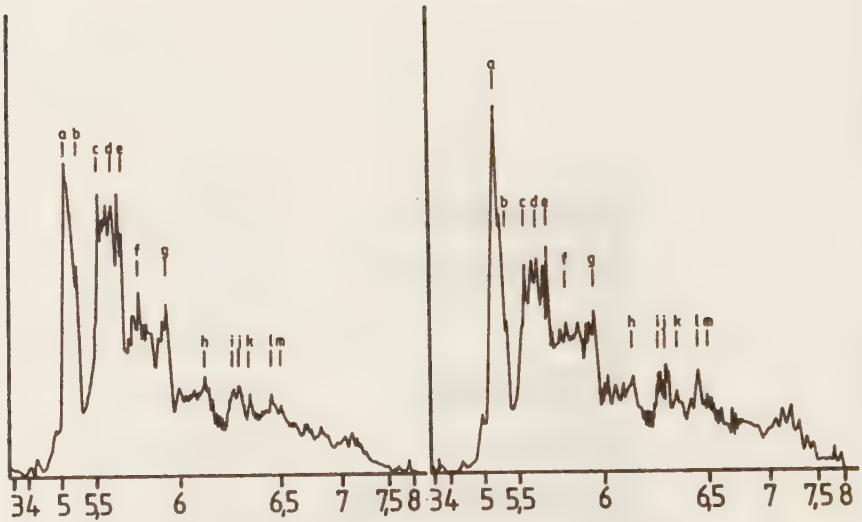


Abb. 8.1: Densitogramm
No1814♂4m

Abb. 8.2: Densitogramm
No1825♀4m

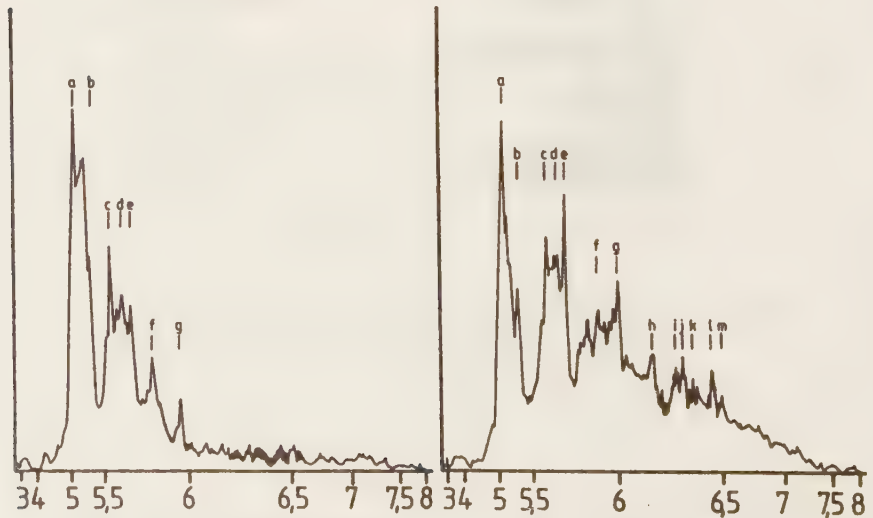


Abb. 8.3: Densitogramm
No1826♀4m

Abb. 8.4: Densitogramm
No1829♂4m

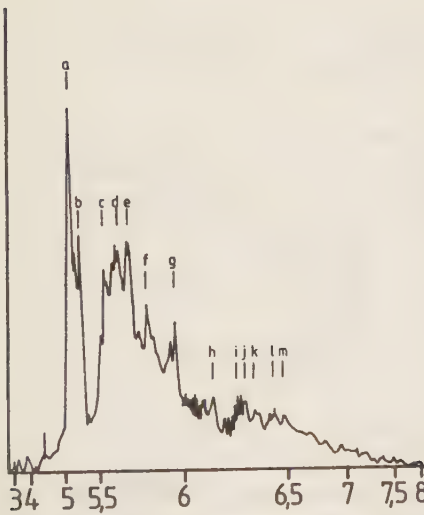


Abb. 8.5: Densitogramm
No18586m

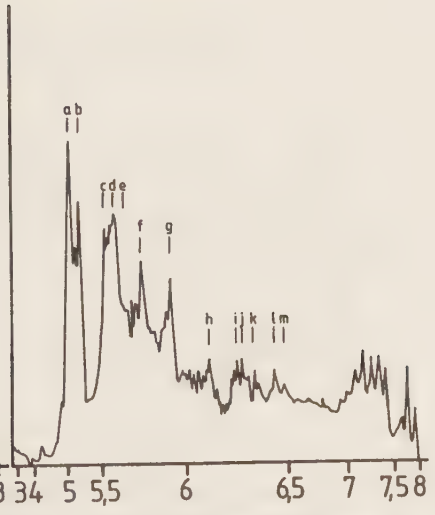


Abb. 8.6: Densitogramm
No18934m

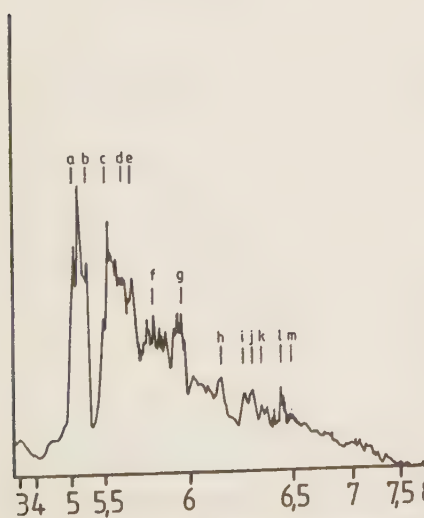


Abb. 8.7: Densitogramm
No18954m

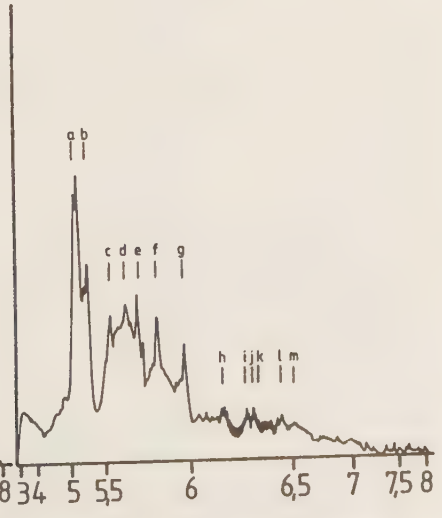


Abb. 8.8: Densitogramm
No20214m

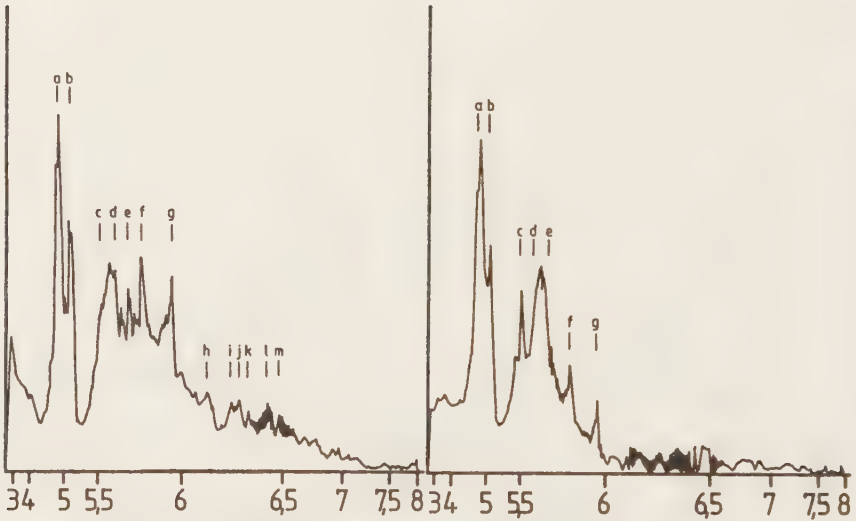


Abb. 8.9: Densitogramm
No203704m

Abb. 8.10: Densitogramm
No20584m

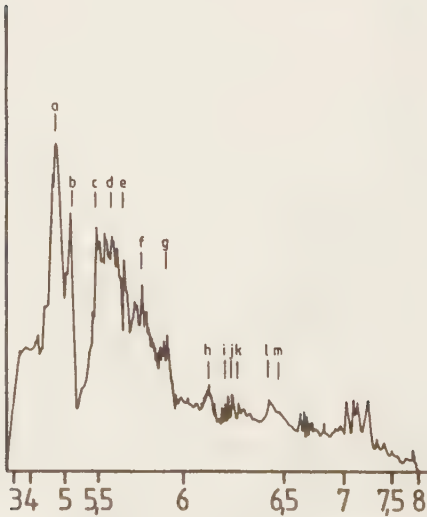


Abb. 8.11: Densitogramm
No209806m

3.3. Isoelektrische Fokussierung von Proteinen aus dem Gesamtserum dysgammaglobulinämischer UM-B19 Hühner

Abbildung 9 gibt das Pherogramm von 13 verschiedenen dysgammaglobulinämischen Hühnerseren beiderlei Geschlechts wieder. Das Alter der Tiere betrug wiederum 4 bzw. 6 Monate; das Serum wurde unverdünnt aufgetragen. Die dysgammaglobulinämischen Proben wurden mit "Dys" gekennzeichnet.

Die diesem Pherogramm zugehörigen Densitogramme finden sich in den Abbildungen 10.1 bis 10.13 wieder.

Bei den Proben Dys1787♂6m, Dys1797♂6m und Dys1822♀6m färben sich im alkalischen Bereich wieder deutliche Hämoglobinbestandteile an.

Sofort in die Augen fallend ist gegenüber den LSL- und normogammaglobulinämischen Seren die starke Intensitätsverminderung des Bandenspektrums im pH-Bereich oberhalb pH 5,5. Besonders auffällig wird diese Abschwächung im pH-Bereich jenseits von Bande g. Objektiviert wird diese starke Intensitätsverminderung durch die sehr kleinen Integrale der Densitogramme im pH-Bereich 6,1-7,0.

Betrachtet man die Banden f und g, so lassen sich diese subjektiv in 2 Intensitätsstufen einteilen:

- 1) Stärkere Intensität: Dys1787♀6m, Dys1831♂4m, Dys1831♂6m, Dys1833♀4m, Dys1836♀4m, Dys1840♀4m, Dys1850♀4m, Dys2015♂4m, Dys2025♂4m
- 2) Schwächere Intensität: Dys1797♂6m, Dys1822♀6m, Dys1834♀6m, Dys1840♀6m

Es ist auffällig, daß sich in der schwächeren Intensitätsstufe nur 6 Monate alte Tiere finden und sich die 4 Monate alten Tiere alle in der stärkeren Intensitätsklasse befinden. Aufgrund der geringen Probenzahl, kann hier jedoch noch keine endgültige Festlegung getroffen werden.

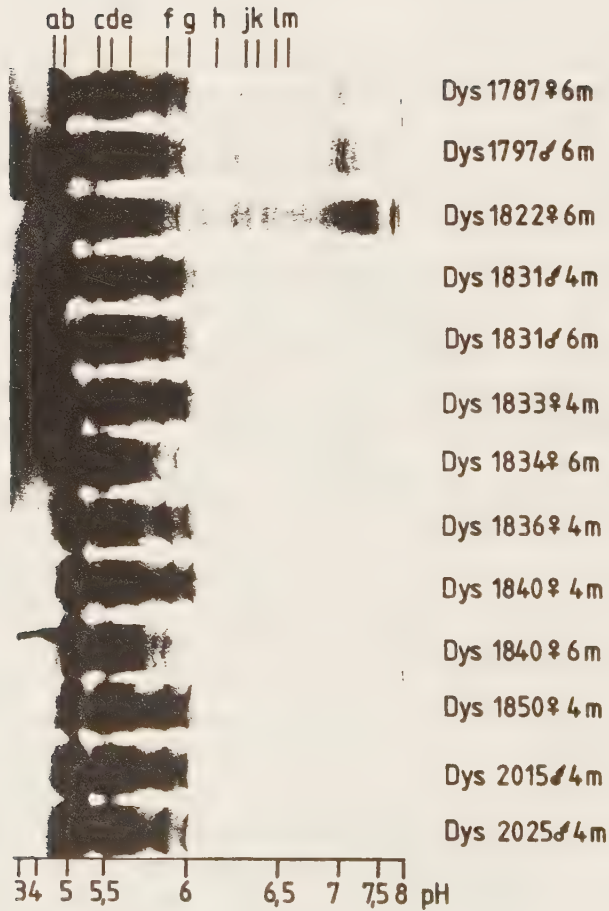


Abb. 9: Proteinphorogramm unverdünnter Sera von dysgamma-
maglobulinämischen UM-B19 Hühnern (=Dys) nach
Coomassiefärbung
(m=Monat)

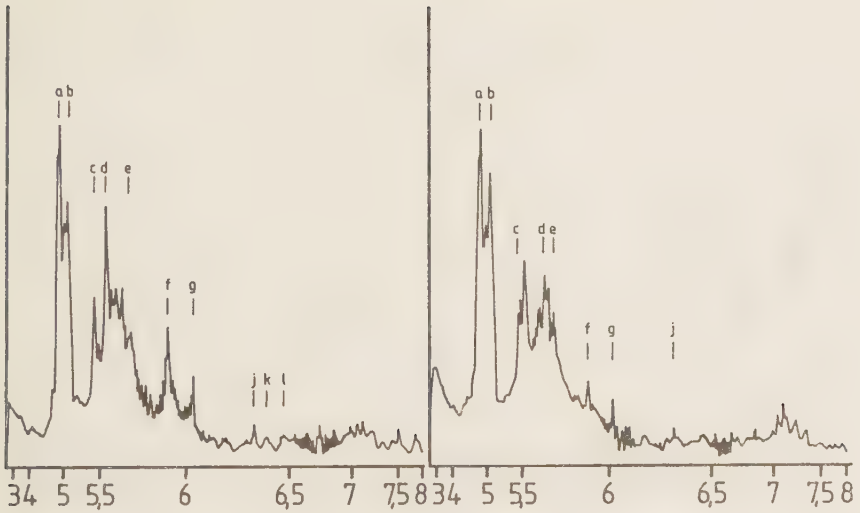


Abb. 10.1: Densitogramm
Dys17876m

Abb. 10.2: Densitogramm
Dys17976m

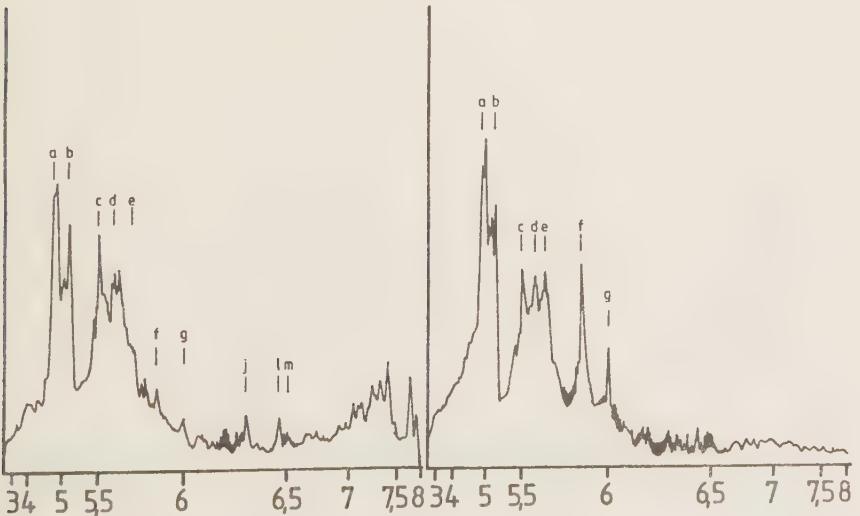
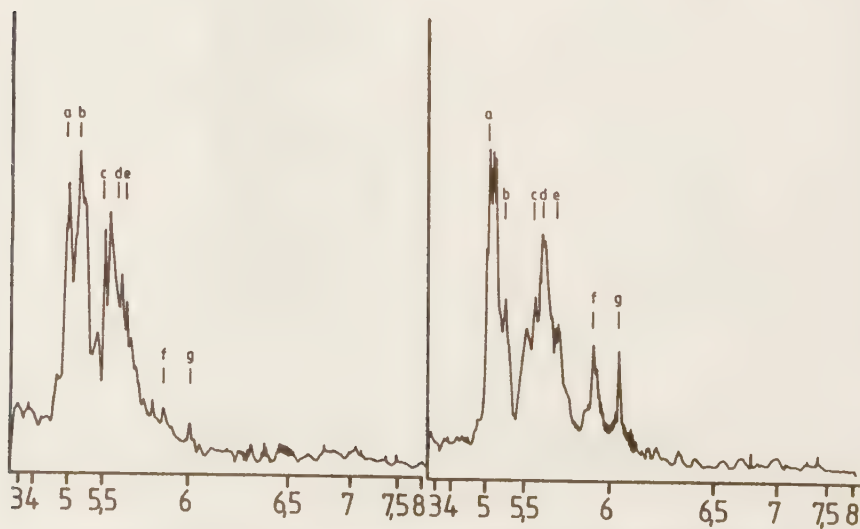
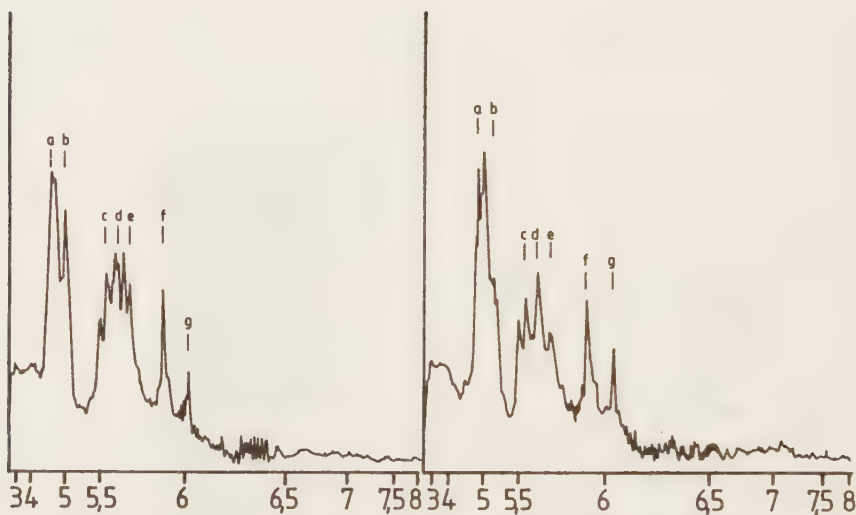


Abb. 10.3: Densitogramm
Dys18226m

Abb. 10.4: Densitogramm
Dys18316m



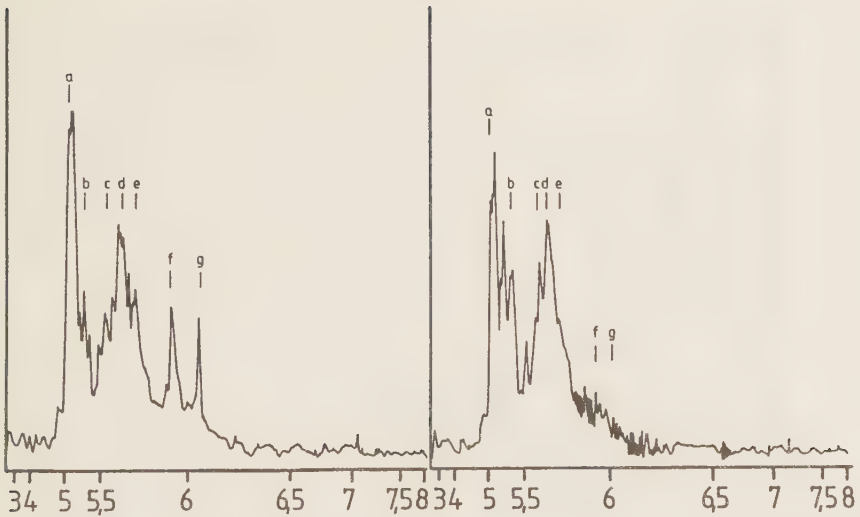


Abb. 10.9: Densitogramm
Dys1840♀4m

Abb. 10.10: Densitogramm
Dys1840♀6m

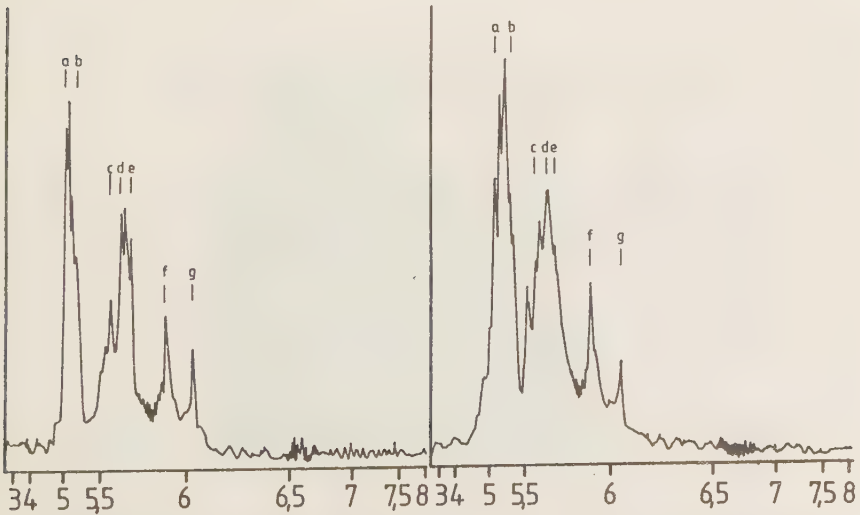


Abb. 10.11: Densitogramm
Dys1850♀4m

Abb. 10.12: Densitogramm
Dys2015♂4m

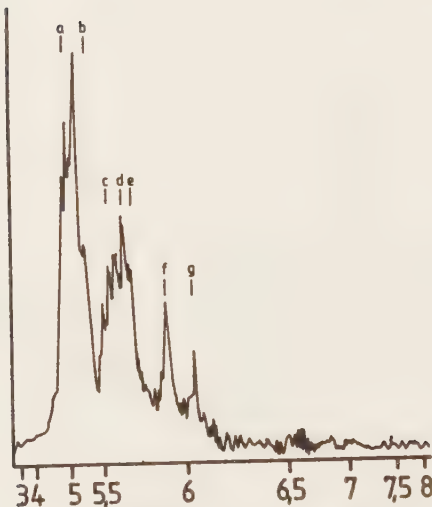


Abb. 10.13: Densitogramm
Dys202564m

3.4. Isoelektrische Fokussierung von Proteinen aus dem Gesamtserum agammaglobulinämischer Hühner

In Abbildung 11 ist das Pherogramm von 6 verschiedenen Seren agammaglobulinämischer Hühner beiderlei Geschlechts zu sehen. Das Alter der Tiere war nicht bekannt. Das Serum wurde unverdünnt aufgetragen. Die agammaglobulinämischen Proben wurden mit "Bx" gekennzeichnet.

Die zu diesem Pherogramm gehörigen Densitogramme sind in den Abbildungen 12.1 bis 12.6 zu sehen.

Bei den Proben Bx110285♀ und Bx161184♀ findet man Serumteile, die die Auftrennung im pH-Bereich 4,0-6,3 überlagern. Die Proteinbanden sind aber auch in diesem Bereich deutlich zu erkennen. Es wurde deshalb, nicht zuletzt aufgrund des sehr geringen zur Verfügung stehenden

Probenvolumens, auf eine Abklärung dieser Überlagerungen verzichtet.

Bei den Proben Bx300185♀, Bx300185♂, Bx110285♀ und Bx161184♀ sind deutliche, bei Bx161184♂ geringe Hämoglobinantile zu erkennen.

Die Proben Bx300185♀, Bx300185♂ und Bx140683♀ unterscheiden sich in der Ausbildung und Intensität ihrer Banden nicht von den dysgammaglobulinämischen Seren.

Bei den Proben Bx110285♀, Bx161184♀ und Bx161184♂ sind im pH-Bereich über 6,0 deutliche einzelne Banden ausgeprägt, allerdings in einer wesentlich geringeren Anzahl als bei den normogammaglobulinämischen und den LSL-Seren. Bei diesen Banden handelt es sich aber, wie bei 3.9. bis 3.11. gezeigt, nicht um Immunglobuline.

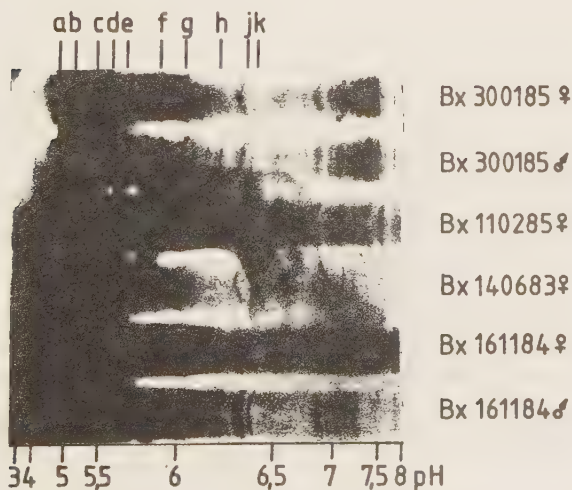


Abb. 11: Proteinphorogramm unverdünnter Sera von agammaglobulinämischen Hühnern (=Bx) nach Coomassiefärbung

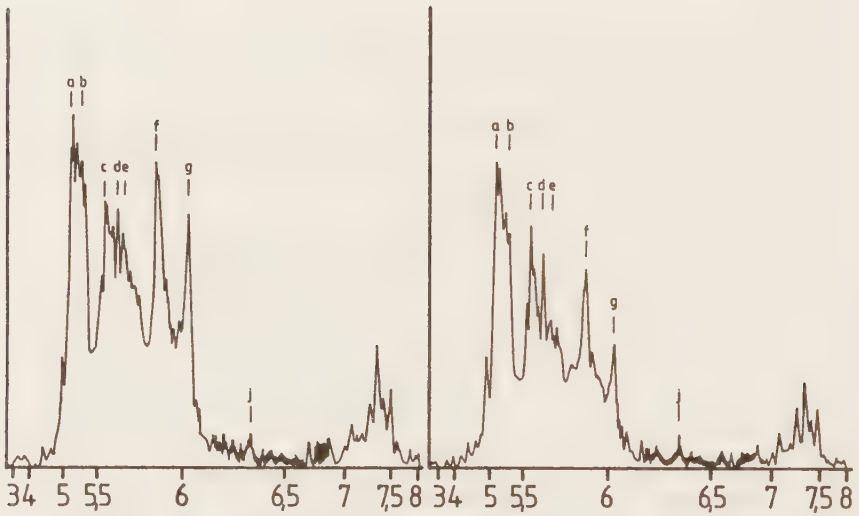


Abb. 12.1: Densitogramm
Bx300185♀

Abb. 12.2: Densitogramm
Bx300185♂

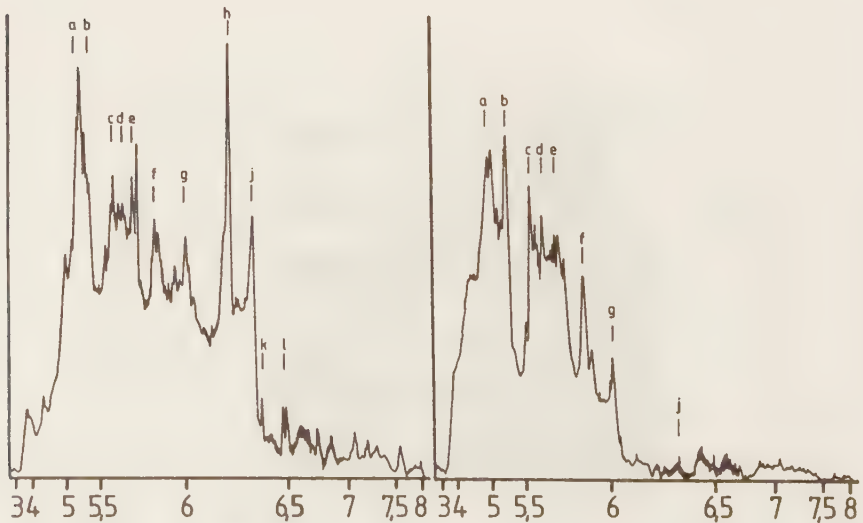


Abb. 12.3: Densitogramm
Bx110285♀

Abb. 12.4: Densitogramm
Bx140683♀

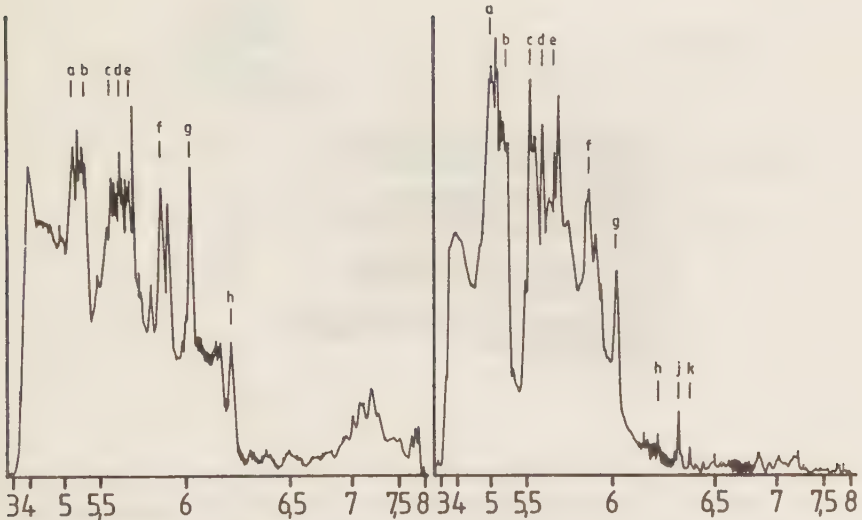


Abb. 12.5: Densitogramm
Bx161184♀

Abb. 12.6: Densitogramm
Bx161184♂

3.5. Isoelektrische Fokussierung von IgG

In Abbildung 13 ist das Pherogramm von nach 2.3. hergestellten IgG-Proben zu sehen. Zum Vergleich sind zusätzlich zwei LSL-Seren (=Ko) aufgetragen.

Es können beim Pherogramm der IgG-Probe mindestens 41 Banden im pH-Bereich 5,5-7,2 unterschieden werden. Der Vergleich mit den beiden LSL-Seren zeigt eine auffällige Übereinstimmung des Bandenmusters in diesem pH-Bereich.



Abb. 13: Proteinphorogramm von IgG aus Hühnerserum nach Coomassiefärbung im Vergleich mit Gesamtserum von ISL-Hühnern (=Ko)
(m=Monat)

3.6. Isoelektrische Fokussierung von IgM

Abbildung 14 gibt das Pherogramm von nach 2.3. hergestellten IgM-Proben wieder.

Zur Verdeutlichung sind Coomassiegefärbte und Silbergefärbte Gele dargestellt.

Es können beim Pherogramm der IgM-Probe mindestens 10 Banden im pH-Bereich 4,0-5,8 unterschieden werden.

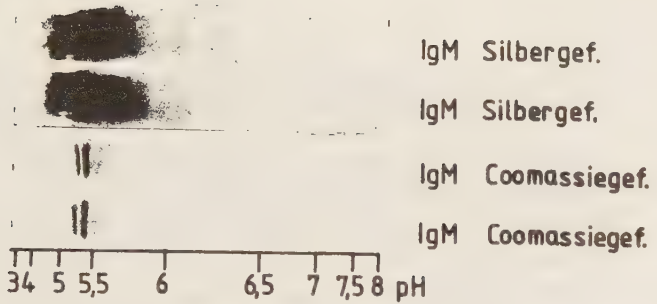


Abb. 14: Proteinphorogramm von IgM aus Hühnerserum

3.7. Isoelektrische Fokussierung von IgA

In Abbildung 15 ist das Pherogramm von nach 2.3. hergestellten IgA-Proben zu sehen. Es sind sowohl Coomassiegefärbte als auch Silbergefärbte Gele dargestellt.

Bei den Pherogrammen der IgA-Proben können mindestens 10 Banden im pH-Bereich 3,0-5,6 unterschieden werden, die allerdings zum Teil so schwach ausgebildet sind, daß sie nur im Originalgel festzustellen sind und auf der Photographie nicht dargestellt werden können.

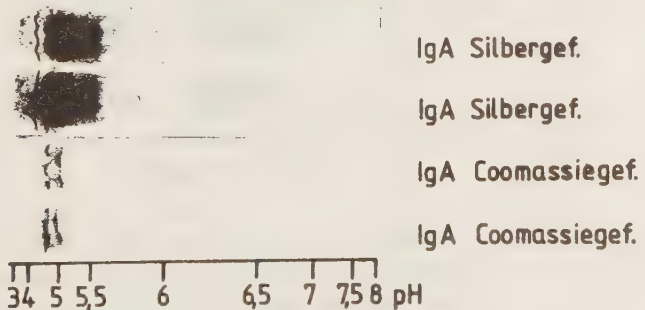


Abb. 15: Proteinphorogramm von IgA aus Hühnerserum

3.8. Isoelektrische Fokussierung von Hämoglobin

In Abbildung 16 ist das Pherogramm von nach 2.5. hergestellten Hühnerhämoglobinproben zu sehen.

Die einzelnen Proben wurden unterschiedlich lange bei Zimmertemperatur gelagert (0, 5, 8, 14, 21, 39 Tage). Zum Vergleich sind Hämoglobinproben vom Pferd und vom Menschen (Fa. Serva) aufgetragen.

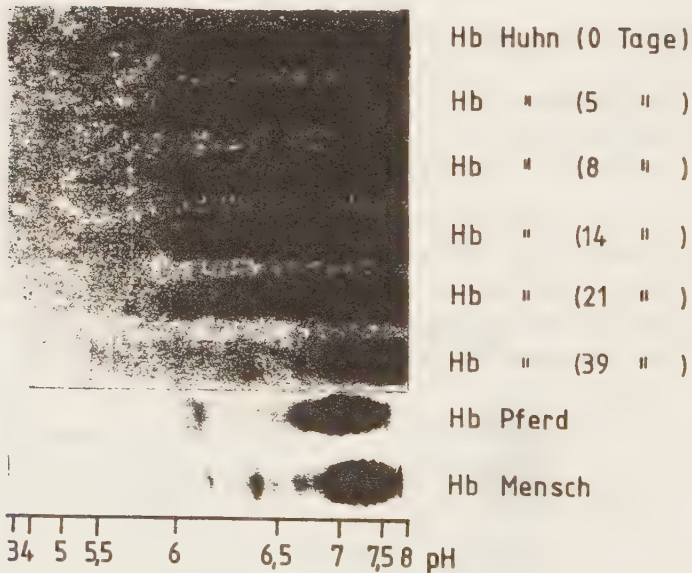


Abb. 16: Proteinpherogramm einer Hämoglobinprobe vom Huhn (in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer), Pferd und Menschen nach Coomassiefärbung

Es haben sich 8 Hauptbanden im pH-Bereich 7,0-8,0 fokussiert, wobei der Großteil des Hämoglobins in der Bande bei pH 7,8 zu finden ist.

Es ist allerdings festzustellen, daß bei dem nach der beschriebenen Methode gewonnenen Hämoglobin Banden im gesamten pH-Bereich größer pH 6,0 zu finden sind.

Im Vergleich mit dem Hämoglobin von Mensch und Pferd ist festzustellen, daß das Hühnerhämoglobin in einem verhältnismäßig alkalischeren Bereich zu finden ist. Die Hauptbande des Pferdehämoglobins ist bei pH 7,0 zu finden, die des Menschenhämoglobins bei pH 7,3.

Deutlich geht aus dem Pherogramm eine Lagerungsdauerabhängige Intensitätsabnahme der einzelnen Banden des Hämoglobins hervor.

3.9. Immunologische Identifizierung von IgG nach Transfer auf Nitrocellulosefolie

Jeweils 3 Serumproben von agammaglobulinämischen, normogammaglobulinämischen, dysgammaglobulinämischen und ISL-Hühnern wurden fokussiert, mittels Diffusionsblotting auf Nitrocellulosefolie übertragen und wie bei 2.9. beschrieben behandelt. Das Ergebnis der Anfärbung ist in Abbildung 17 dargestellt.

Als 1. Antikörper wurde ein am hiesigen Institut hergestelltes Anti-IgG aus Kaninchen verwendet, als 2. Antikörper ein Peroxidasegekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG aus der Ziege (Fa. Paesel).

Bei den normogammaglobulinämischen Proben ist eine starke Anfärbung des pH-Bereiches 5,5-7,2 zu finden. Einzelne Banden können dabei nur vereinzelt unterschieden werden.

Bei den LSL-Hühnern sieht man intensive Anfärbungen im pH-Bereich 5,5-7,0. Die Proben Ko106m und Ko306m weisen dabei gegenüber Ko14m eine etwas verminderte Intensität auf.

Bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern sind nur sehr schwache, undeutliche Banden zu erkennen.

Dies gilt in ähnlicher Form für die agammaglobulinämischen Proben. Hier ist bei Bx110285♀ praktisch keine Anfärbung festzustellen, während die IgG-Banden bei Bx300185♀ und Bx300185♂ eher stärker ausgeprägt sind, als jene bei den dysgammaglobulinämischen Proben.

Zusammenfassend ist festzustellen:

- a) Das immunologisch nachgewiesene IgG stimmt mit dem Pherogramm des nach 2.3. isolierten IgG überein. (Vergleiche 3.5. und Abb. 13)
- b) Es ist ein eindeutiger Unterschied, in Bezug auf den IgG-Gehalt, zwischen immunologisch intakten und immunologisch defekten Hühnern festzustellen.
- c) Proben von agammaglobulinämischen und dysgammaglobulinämischen Hühnern sind durch den IgG-Nachweis nicht unterscheidbar.

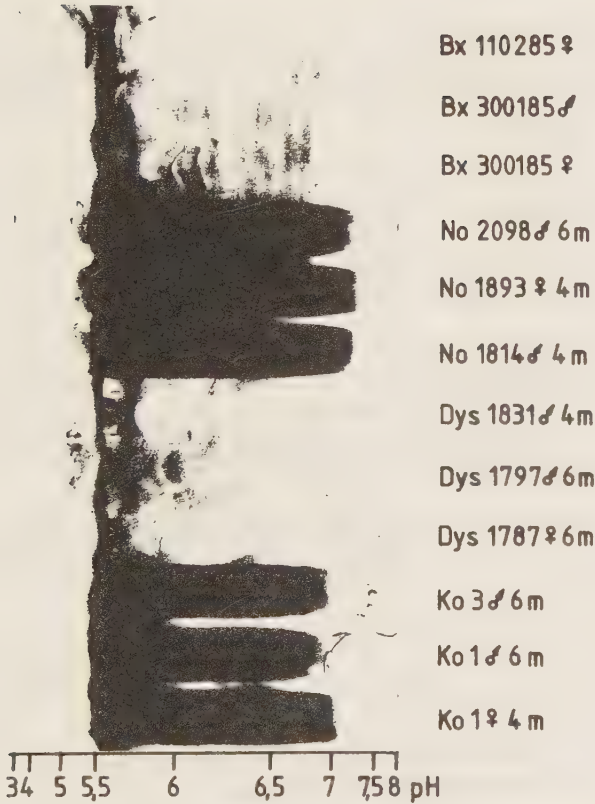


Abb. 17: Immunologischer Nachweis von IgG aus dem Gesamtserum agammaglobulinämischer (=Bx), normogammaglobulinämischer (=No), dysgammaglobulinämischer (=Dys) und immunologisch intakter LSL-Hühner (=Ko) nach Diffusionsblotting auf Nitrocellulosefolie und Immunoperoxidasefärbung (m=Monat)

3.10. Immunologische Identifizierung von IgM nach Transfer auf Nitrocellulosefolie

Jeweils 3 Serumproben von agammaglobulinämischen, normogammaglobulinämischen, dysgammaglobulinämischen und LSL-Hühnern wurden fokussiert, geblottet, immunofixiert und gefärbt.

Als 1. Antikörper wurde ein am hiesigen Institut hergestelltes Anti-IgM aus Kaninchen verwendet, als 2. Antikörper ein Peroxidasegekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG aus der Ziege (Fa. Paesel).

Die Anfärbung ist in Abbildung 18 dargestellt.

Die relativ stärksten Anfärbungen sind bei den dysgammaglobulinämischen Seren zu finden, wobei Dys1797⁰6m als deutlichste Probe IgM-Banden im pH-Bereich 4,0-5,8 aufweist. Dies stimmt mit den in 3.6. beschriebenen Ergebnissen überein. (Vergleiche Abb. 14)

Die LSL-Proben zeigen nur sehr undeutliche IgM-Anfärbungen, wobei das IgM von Ko1⁰4m etwas deutlicher ausgeprägt ist.

Die normogammaglobulinämischen Seren liegen in ihrer IgM-Intensität zwischen jener der dysgammaglobulinämischen und jener der LSL-Seren.

Bei den agammaglobulinämischen Serumproben ist keinerlei IgM-Anfärbung festzustellen.

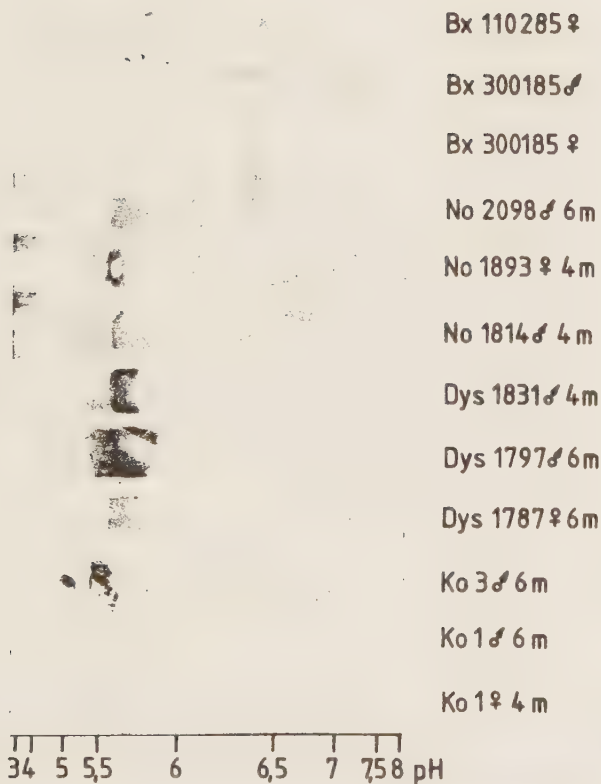


Abb. 18: Immunologischer Nachweis von IgM aus dem Gesamtserum agammaglobulinämischer (=Bx), normogammaglobulinämischer (=No), dysgammaglobulinämischer (=Dys) und immunologisch intakter LSL-Hühner (=Ko) nach Diffusionsblotting auf Nitrocellulosefolie und Immunoperoxidasefärbung (m=Monat)

3.11. Immunologische Identifizierung von IgA nach Transfer auf Nitrocellulosefolie

Jeweils 3 Serumproben von agammaglobulinämischen, normogammaglobulinämischen, dysgammaglobulinämischen und LSL-Hühnern wurden fokussiert, geblottet, immunofixiert und gefärbt.

Als 1. Antikörper wurde ein am hiesigen Institut hergestelltes Anti-IgA aus Kaninchen verwendet, als 2. Antikörper ein Peroxidasegekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG aus der Ziege (Fa. Paesel).

Die Anfärbung ist in Abbildung 19 wiedergegeben.

Die deutlichsten IgA-Anfärbungen finden sich bei Dys1797^{6m} und Dys1831^{4m}. Die gefundenen IgA-Banden liegen hierbei im pH-Bereich 4,0-5,6, während das bei 3.7. untersuchte IgA Banden im pH-Bereich 3,0-5,6 aufwies. (Vergleiche Abb. 15)

Bei den stärkeren Hauptbanden ist jedoch eine signifikante Übereinstimmung zwischen dem immunologisch nachgewiesenen IgA und dem Pherogramm des IgA in 3.7. zu erkennen.

Die 3 LSL-Proben und die Probe Dys1787^{96m} weisen schwächere, jedoch noch deutliche IgA-Anfärbungen auf.

Subjektiv noch etwas schwächer erscheinen die IgA-Banden der normogammaglobulinämischen Proben.

Bei den agammaglobulinämischen Proben kann kein IgA nachgewiesen werden.

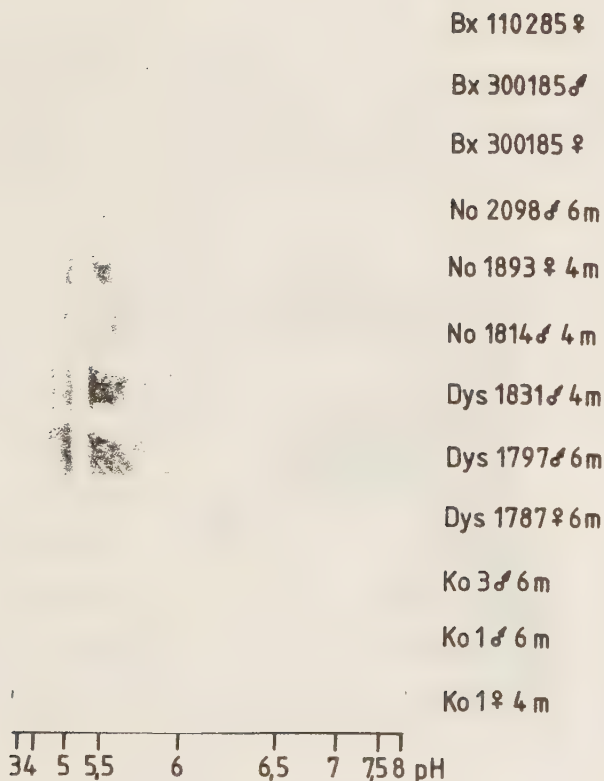


Abb. 19: Immunologischer Nachweis von IgA aus dem Gesamtserum agammaglobulinämischer (=Bx), normogammaglobulinämischer (=No), dysgammaglobulinämischer (=Dys) und immunologisch intakter ISL-Hühner (=Ko) nach Diffusionsblotting auf Nitrocellulosefolie und Immunoperoxidasefärbung (m=Monat)

3.12. Unterscheidung immunologisch normaler und defekter Hühner durch Anwendung der Isoelektrischen Fokussierung

In Abbildung 20 ist das Coomassiegefärbte Pherogramm jeweils zweier Proben von agammaglobulinämischen, dysgammaglobulinämischen, normogammaglobulinämischen und LSL-Hühnern dargestellt. Die zugehörigen Densitogramme sind in den Abbildungen 21.1 bis 21.8 zu finden.

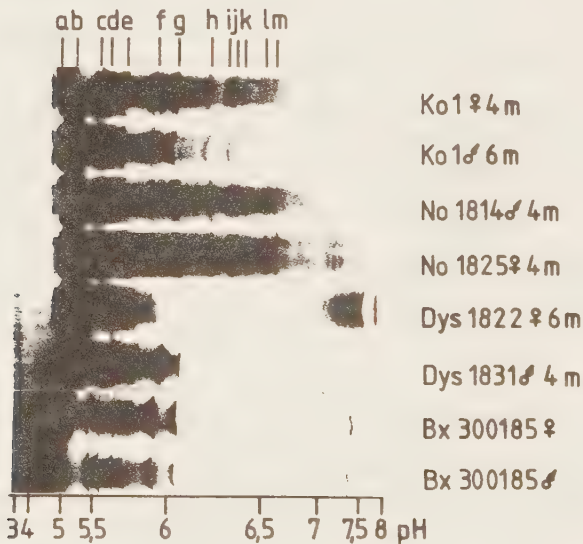


Abb. 20: Proteinpherogramm von Gesamtsera immunologisch normaler und defekter Hühner nach Coomassiefärbung (Bx=agammaglobulinämische, Dys=dysgammaglobulinämische, No=normogammaglobulinämische und Ko=intakte LSL-Hühner; m=Monat)

Aus dem Pherogramm lassen sich subjektiv, durch Beurteilung der Bandenintensität im pH-Bereich größer 5,5 und insbesondere jenseits von Bande f und g, die Proben deutlich den Klassen immunologisch defekt oder immunologisch normal zuordnen.

Objektiviert wird dies durch die Integrale der Densitogrammkurven im pH-Bereich 6,1-7,0, wobei die Integrale der immunologisch defekten Hühner deutlich kleiner sind als jene der immunologisch normalen Hühner.

Keine Unterscheidung kann durch die Isoelektrische Fokussierung mit anschließender Coomassiefärbung, zwischen dysgammaglobulinämischen und agammaglobulinämischen Seren gemacht werden.

Dies gilt ebenfalls für die Unterscheidung von LSL-Seren und von normogammaglobulinämischen UM-B19 Seren.

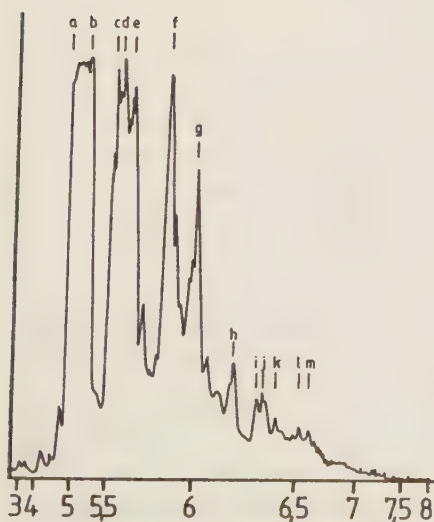


Abb. 21.1: Densitogramm

Ko144m

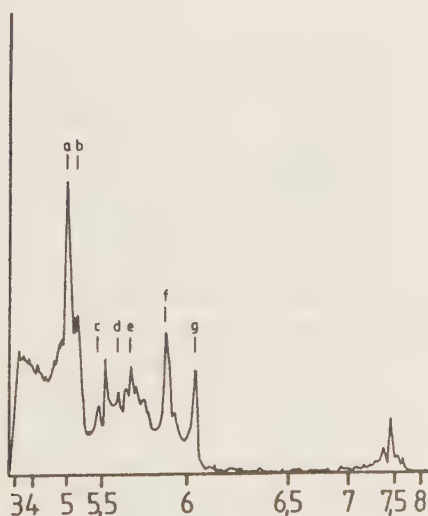


Abb. 21.2: Densitogramm

Bx300185P

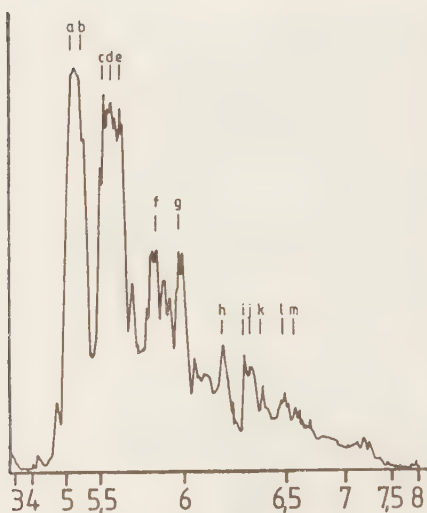


Abb. 21.3: Densitogramm
No181404m

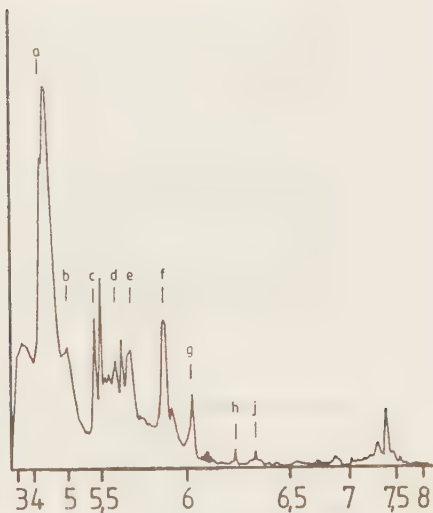


Abb. 21.4: Densitogramm
Bx300185o

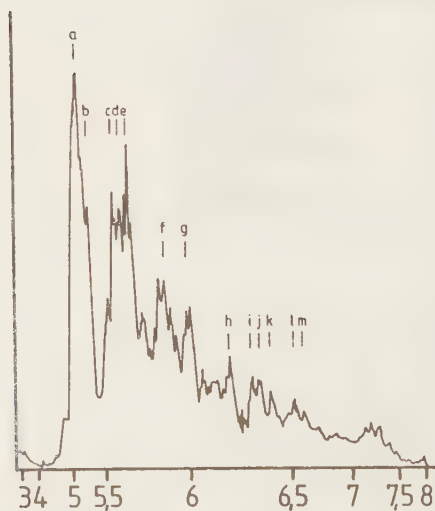


Abb. 21.5: Densitogramm
No182544m

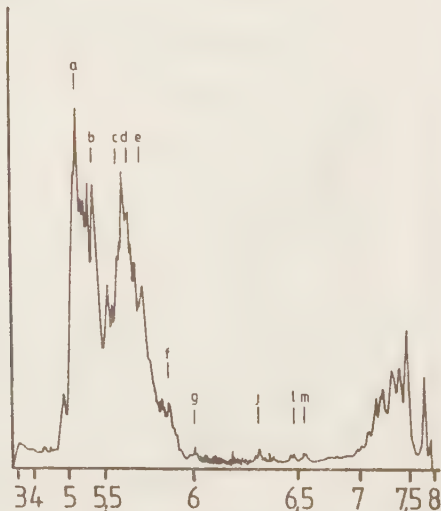


Abb. 21.6: Densitogramm
Dys182246m

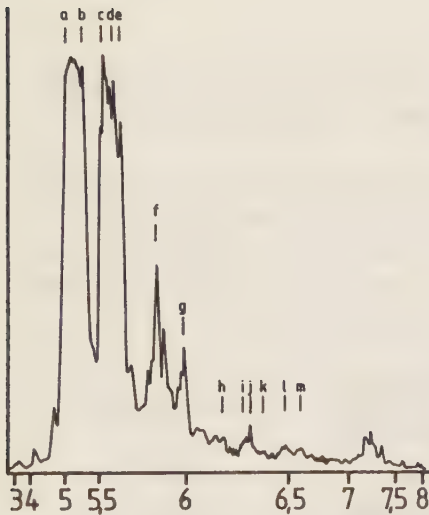


Abb. 21.7: Densitogramm
Ko106m

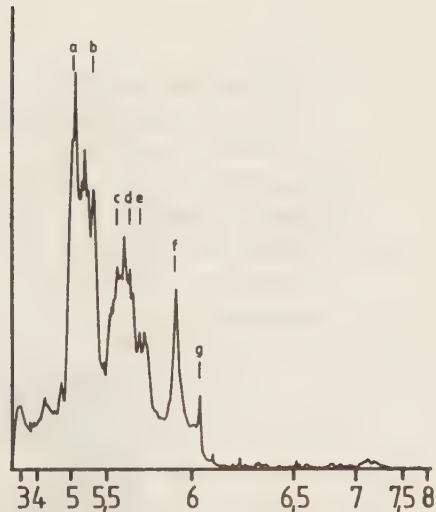


Abb. 21.8: Densitogramm
Dys183104m

In Abschnitt 3.2. wurde die in den vorhergehenden Absätzen getroffene Feststellung, daß mit Hilfe der Coomassiegefärbten Pherogramme die Zuordnung - immunologisch defekt oder normal - möglich ist, vorweggenommen und behauptet, daß es sich bei den Proben No1826[♀]4m und No2058[♀]4m in Wirklichkeit um dysgammaglobulinämische Seren handelt.

In Abschnitt 3.9. wurde gezeigt, daß sich mit dem immunologischen Nachweis von IgG nach Fokussierung und Blotting auf Nitrocellulosefolie, die Seren eindeutig den Klassen immunologisch defekt oder immunologisch normal zuordnen lassen.

Die normogammaglobulinämischen Proben wurden deshalb nach dieser Methode untersucht. Die Anfärbung ist in Abbildung 22 dargestellt. (Vergleiche auch Abb. 7)

Aus der Abbildung wird sofort deutlich, daß No1826♀4m einen stark, No2058♀4m einen sehr stark verminderten IgG-Gehalt aufweisen.

Die mit Hilfe der Coomassiefärbung und den zugehörigen Densitogrammen getroffene Feststellung, daß es sich bei diesen beiden Proben in Wirklichkeit um dysgammaglobulinämische Seren handelt, läßt sich also mit dem immunologischen IgG-Nachweis eindeutig verifizieren.

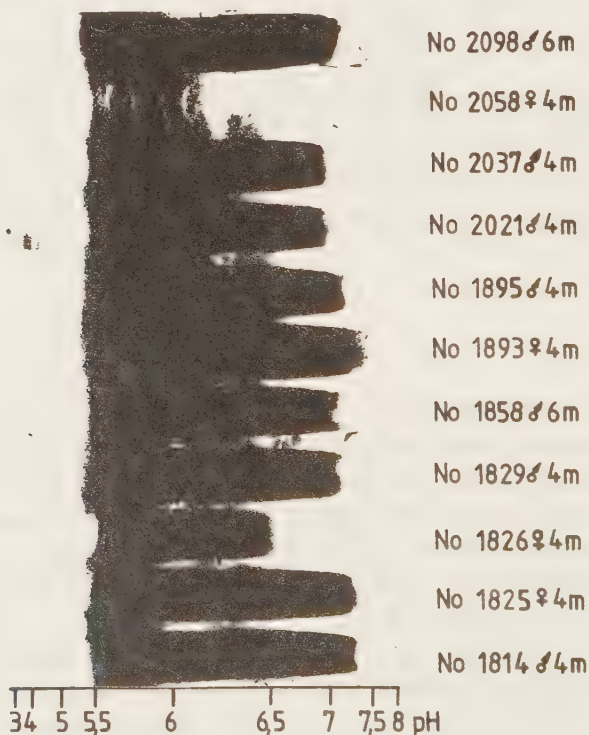


Abb. 22: Immunologischer IgG-Nachweis im Serum von normogammaglobulinämischen UM-B19 Hühnern (=No) nach Diffusionsblotting auf Nitrocellulosefolie und Immunoperoxidasefärbung (vergl. Abb. 7)
(m=Monat)

3.13. Isoelektrische Fokussierung von Proteinen aus dem Gesamtserum 4 Wochen alter Hühner

Aus finanziellen und versuchstechnischen Gründen ist es wünschenswert, die Hühner möglichst frühzeitig in dysgammaglobulinämische und normogammaglobulinämische Tiere unterscheiden zu können.

Es wurde deshalb untersucht, ob sich mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methoden, diese Feststellung bereits bei 4 Wochen alten Tieren treffen läßt.

Abbildung 23 zeigt das Pherogramm 11 verschiedener Serumproben von 4 Wochen alten UM-B19 Hühnern beiderlei Geschlechts. Die Proben 3486♂, 3493♀, 3495♀, 3497♂ und 3499♀ enthielten dabei sehr viel Hämoglobin.

Dieser Hämoglobianteil, der aufgrund der zum Teil sehr geringen gewonnenen Blutmenge auch nicht zu beseitigen war, macht eine Beurteilung, im Hinblick auf den Immunglobulingehalt, für diese Proben unmöglich.

Für die restlichen 6 Proben ist festzustellen, daß die Proben 516♀ und 3480♀ gegenüber 3466♀, 3482♀, 3489♂ und 3492♀ eine deutlich höhere Bandenintensität im pH-Bereich oberhalb von Bande h haben.

Insgesamt muß festgehalten werden, daß die Coomassiegefärbten Pherogramme für die Festlegung des Immunstatus bei 4 Wochen alten Hühnern, aufgrund des teilweise starken Hämoglobingehaltes im Serum, nicht möglich war.

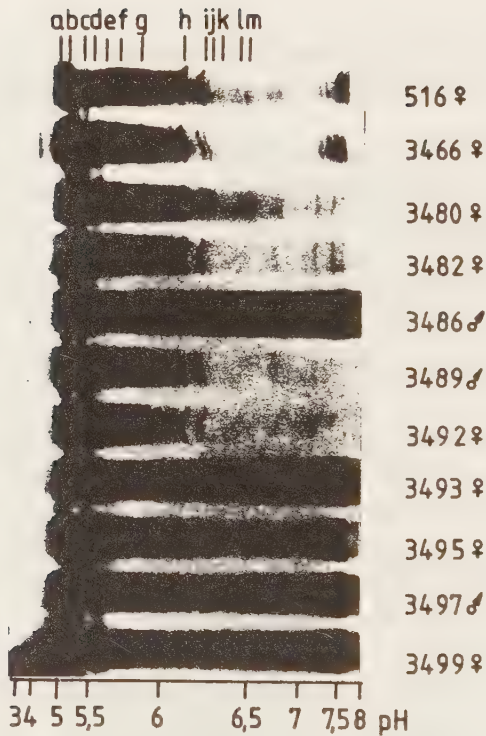


Abb. 23: Proteinphorogramm unverdünnter Sera von 4 Wochen alten UM-B19 Hühnern nach Coomassiefärbung

Es wurde deshalb versucht, mit dem immunologischen IgG-Nachweis nach Fokussierung und Transfer auf Nitrocellulosefolie, die Unterscheidung in dysgammaglobulinämisch und normogammaglobulinämisch zu treffen. Das Ergebnis der Anfärbung ist in Abbildung 24 zu sehen.

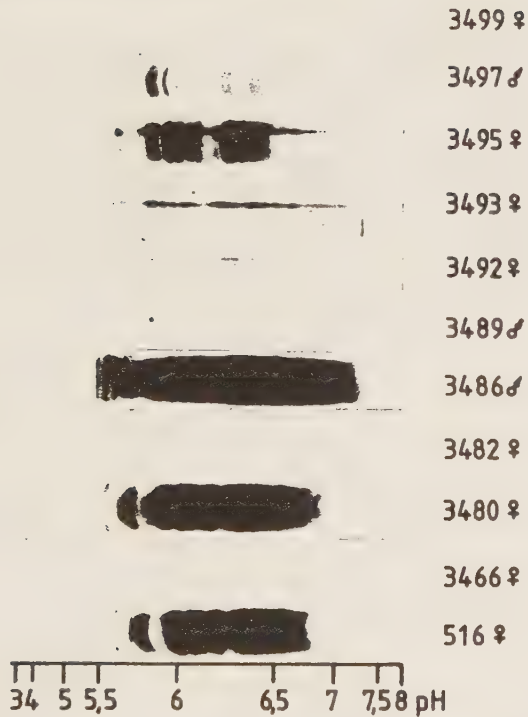


Abb. 24: Immunologischer IgG-Nachweis im Serum von 4 Wochen alten UM-B19 Hühnern nach Diffusionsblotting auf Nitrocellulosefolie und Immunoperoxidasefärbung (vergl. Abb. 23)

Aus der Abbildung wird sofort klar ersichtlich, daß mit dieser Methode eine eindeutige Zuordnung der Tiere bereits im Alter von 4 Wochen möglich ist.

Die Serumproben 516♀, 3480♀ und 3486♂ sind eindeutig

normogammaglobulinämisch, die restlichen Proben dysgammaglobulinämisch.

Auch die Serumprobe 3495^Q ist, obwohl sie deutlich wahrnehmbare IgG-Banden aufweist, aufgrund ihres ebenso deutlich verringerten IgG-Gehaltes, als dysgammaglobulinämisch zu bezeichnen. Es könnte sich bei dieser Serumprobe allerdings um eine transitorische Dysgammaglobulinämie handeln, bei der sich nach einigen Wochen oder Monaten ein der Norm ähnliches Immunglobulinmuster einstellt (LÖSCH et al., 1981).

4. DISKUSSION

4.1. Isoelektrische Fokussierung von Hühner-Serum-proteinen

Soweit verbreitet die Isoelektrische Fokussierung in der Humanmedizinforschung ist, so wenig hat sie noch Eingang in die Untersuchung von Physiologie und Pathologie des Geflügels gefunden.

So konnte in der Literatur keine einzige Beschreibung der Fokussierung von Vogelgesamtserum gefunden werden. Die Anwendung der Isoelektrischen Fokussierung in der Geflügelforschung beschränkte sich bisher auf die Untersuchungen von Einzelproteinen.

So verwandten BOURS (1974) und MISHIMA und IKEDA (1983) die Isoelektrische Fokussierung zur Untersuchung von Linsenkristallen, PHILLIPS et al. (1976) zur Charakterisierung von bisalbuminämischen Puten-Hühner-Hybriden, WINKLER und SANDERS (1977) zur Charakterisierung eines β_2 -Mikroglobulinähnlichen Proteins. HATTORI und WAKABAYASHI (1979) fokussierten Vogel-Luteinisierungshormon, ZARETSKII et al. (1978) Hühnerinterferone. SORKINA und BOODINA (1980) charakterisierten mit der Isoelektrischen Fokussierung das Serumalbumin von heterogenen Hühnerhybriden, TEGELSTROEM et al. (1982) benutzten sie für Systematikuntersuchungen mit Muskelproteinen, KAI et al. (1983) für die Bestimmung des Komplementfaktors C3 von Japanischen Wachteln. JAY (1983) charakterisierte mit der Isoelektrischen Fokussierung ein Hühner-Erythrozyten-Anion-Austausch-Protein und GRIM et al. (1984) verwandten fokussierte Carboxyesterase als biologische Marker in Chimären.

Die einzigen Untersuchungen, die für die vorliegende

Arbeit herangezogen werden können, kommen von LEE et al. (1976), die Hühnerhämoglobin in Polyacrylamidgelen fokussiert haben und von LOEKEN und ROTH (1983), welche Hühner-IgG ebenfalls in Polyacrylamidgelen fokussierten. KOCH et al. (1985) bestimmten die Komplementfaktoren C3 und B bei Mensch und Huhn nach Fokussierung und Immunoblotting.

4.2. Isoelektrische Fokussierung in Agarosegelen

Die Isoelektrische Fokussierung in Agarosegelen erwies sich als eine, nach Einarbeitung und Fehlerberichtigung, wie zum Beispiel penible Beachtung auf ausreichendes Kühlmittel zwischen Gel und Kühlblock, leicht und problemlos zu handhabende Analysentechnik.

Nicht in den Griff zu bekommen war allerdings in der vorliegenden Arbeit die Verwendung der extrem sauren Ampholyte pH 2,5-4,5.

Im Hinblick darauf, daß das pI-Spektrum des Hühnerserums wie gezeigt bei pH 2,8 beginnt und im Hinblick darauf, daß es durch die Zumischung der Ampholyte pH 2,5-4,5 zu einer starken Spreizung des pH-Bereiches des hier besonders interessierenden IgG kam, wurden die durch die extrem sauren Ampholyte bedingten pH-Verzerrungen im sauren Bereich in der vorliegenden Arbeit in Kauf genommen.

Wie bereits erwähnt, weiten sich diese Verzerrungen bei mengenmäßig höherer Zumischung der Ampholyte pH 2,5-4,5 über das ganze Gel aus.

Sollten den Untersucher nur bestimmte Proteinbanden interessieren, ist es im Hinblick auf die bessere optische

Darstellung wohl angezeigt, auf den extrem sauren pH-Bereich zu verzichten.

Es sei an dieser Stelle erwähnt, daß es in der vorliegenden Arbeit nicht möglich war, eine Fokussierung in Agarosegelen mit dem alleinigen pH-Bereich 2,5-4,5, wie sie bei ALLEN et al. (1984) und einer Anleitung der Fa. PHARMACIA (1982) zu finden sind, durchzuführen. Es kam dabei jeweils nach kurzer Zeit zum kompletten Abriß des Gels.

4.3. Bandenmuster der Hühnergesamtseren

Bei der Fokussierung der Seren von normo- und dysgamma-globulinämischen UM-B19, agammaglobulinämischen und immunologisch intakten Leghorn-Hühnern ist folgendes festzuhalten:

- a) Die Hühnerseren weisen Proteinbanden im pH-Bereich 2,8-8,0 auf.
- b) Die Seren zeigen ein konstantes Bandenmuster.
- c) Normogammaglobulinämische UM-B19 Hühner und ISI-Hühner sind anhand des Bandenmusters nicht unterscheidbar.
- d) Dys- und agammaglobulinämische Hühner sind anhand des Bandenmusters nicht unterscheidbar.
- e) Bei 4 bzw. 6 Monaten alten Hühnern ist anhand des Bandenmusters eine Unterscheidung in immunologisch defekt oder intakt zu treffen.

Wie bereits erwähnt, konnte in der Literatur keine Vergleichsangabe gefunden werden.

4.4. Isoelektrische Fokussierung der Immunglobuline

TENENHOUSE und DEUTSCH (1966) ordneten der normalen γ -Globulinfraktion des Huhnes einen Isoelektrischen Punkt nahe 5,2 zu

LOEKEN und ROTH (1983) fokussierten Serum- und Dotter-IgG vom Huhn in Polyacrylamidgelen und fanden dabei übereinstimmende Isoelektrische Punktbereiche zwischen pH 6,5 und 9,0.

In der vorliegenden Arbeit ergaben sich für die Isoelektrischen Punkte der Immunglobuline folgende pH-Bereiche:

pH 5,5-7,2 beim IgG

pH 4,0-5,8 beim IgM

pH 3,0-5,6 beim IgA

Angaben zu Isoelektrischen Punkten von IgM und IgA des Huhnes wurden in der Literatur nicht gefunden.

Dies erklärt sich wohl auch damit, daß mit der bisher meist verwendeten Polyacrylamidgeltechnik nur Proteine mit einem Molekulargewicht von maximal 200000 bis 300000 Dalton untersucht werden können, und somit die Polyacrylamidgelelektrofokussierung für IgM und IgA vom Huhn nicht geeignet ist.

Das Molekulargewicht des IgM des Huhnes wurde von LESLIE und CLEM (1969) mit etwa 890000 angegeben. KOBAYASHI und HIRAI (1980) fanden beim Huhn zwei verschiedene Formen von IgM, die unterschiedliche Molekulargewichte besaßen. Der Hauptteil (70 %) bestand aus einem IgM mit einem Molekulargewicht von 860000, das Molekulargewicht des übrigen IgM betrug 680000. Die Autoren nahmen an, daß es sich hierbei um die pentamere bzw. die tetramere Form des IgM handelte. SCHRANNER und LÖSCH (1986) bestimmten pentameres IgM mit einem Molekulargewicht von

920000 und IgM in seiner monomeren Form mit einem Molekulargewicht von 184000.

Für das Molekulargewicht des IgA vom Huhn werden von LESLIE und MARTIN (1973) 170000 bis 180000 für die monomere und 350000 bis 360000 für die dimere Form angegeben. SCHRANNER und LÖSCH (1986) fanden 340000 für die dimere und 170000 für die monomere Form des IgA.

Das Molekulargewicht des IgG vom Huhn beträgt dagegen etwa 170000 (LESLIE and CLEM, 1969) und kann damit auch unter Verwendung von Polyacrylamidgelen fokussiert werden.

4.5. Isoelektrische Fokussierung von Hämoglobin

LOEKEN und ROTH (1983) fokussierten Hühnerhämoglobin im pH-Bereich 7,3-9,0. Dabei traten 4 Banden auf. Diese 4 Banden fanden auch LEE et al. (1976), allerdings im pH-Bereich 6,72-7,53, wobei es sich nach ihren Angaben um die Banden von HbA₁ (pI=7,53), HbA₂ (pI=7,37), HbD₁ (pI=6,92) und HbD₂ (pI=6,72) handelt.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei der Fokussierung des Hühnerhämoglobins mindestens 8 Banden im pH-Bereich 7,0-8,0 gefunden.

Nach OBERTHÜR et al. (1985) können beim Huhn 8 Hämoglobine nachgewiesen werden, im adulten Stadium zwei Komponenten: die Hauptkomponente HbA mit 60-80 % und HbD mit 20-40 %.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, daß ähnlich wie beim menschlichen Hämoglobin die Hämoglobine A₁, A₂, D₁ oder D₂ des Huhnes aufgrund der isoelektrischen Auftrennung nochmals zu unterteilen sind

(z.B. in A_{1a} , A_{1b} , A_{1c}). Es würde den Rahmen der vorliegenden Arbeit aber bei weitem sprengen, wenn hier ein Vergleich mit der Vielzahl von Arbeiten über das menschliche Hämoglobin angestellt werden sollte.

Da das hier ebenfalls fokussierte Human-Hb in seinen pI-Werten den in der Literatur angegebenen Werten entspricht, muß jedenfalls davon ausgegangen werden, daß die in der vorliegenden Arbeit ermittelten pI-Werte für das Hühner-Hb der Wirklichkeit am nächsten kommen.

4.6. Silberfärbung

Ausgehend von einer von KERENYI und GALLYAS (1972) beschriebenen Technik, entwickelten WILLOUGHBY und LAMBERT (1983) eine Methode der Silberfärbung von Proteinen in Agarosegelen. Sie erreichten damit eine 10mal empfindlichere Anfärbung als mit Coomassie Blue, bei fokussiertem IgG aus menschlicher Cerebrospinalflüssigkeit. BLACK (1985) beschreibt mit einer leicht modifizierten Methode eine 20-fache Empfindlichkeitserhöhung durch die Silberfärbung gegenüber Coomassie Brilliant Blue G-250. VESTERBERG und GRAMSTRUP-CHRISTENSEN (1984) berichten von einer 30-fachen Farbeempfindlichkeitserhöhung bei der Anfärbung von Humanserumalbumin, Humantransferrin, Lysozym und Cytochrom c.

Die in der vorliegenden Arbeit mit der Silberfärbung gemachten Erfahrungen zeigen ebenfalls eine deutliche Farbeempfindlichkeitserhöhung gegenüber der Coomassiefärbung. Jedoch ist diese Feststellung nicht zu pauschalisieren, sondern es sind erhebliche Unterschiede in der Farbeempfindlichkeitserhöhung der einzelnen Protein-

banden festzustellen. Gerade bei den Banden des IgG war nur eine geringe Erhöhung der Färbeintensität durch Silberfärbung gegenüber der Coomassiefärbung festzustellen.

Wendet man die Silberfärbung für die Proteindarstellung nach Transfer auf Nitrocellulosefolie an, so erfolgt die Anfärbung der einzelnen Banden analog der Färbeintensität direkt im Gel. Hieraus darf geschlossen werden, daß die beschriebene unterschiedliche Färbeintensitätserhöhung durch Silberfärbung nur durch die unterschiedlichen Proteine bedingt wird und unabhängig vom jeweiligen Proteinträger ist.

Die hier beschriebene Silberfärbung bietet gegenüber anderen Anfärbemethoden der geblotteten Proteine, wie Färbung mit Amidoschwarz oder Coomassieblau, vor allem aufgrund der geringeren Hintergrundfärbung deutliche Vorteile.

Auch gegenüber einer von YUEN et al. (1982) beschriebenen Methode der Silberfärbung von geblotteten Proteinen hat die hier beschriebene Methode Vorteile. Das Resultat der Methode nach YUEN et al. liegt jeweils erst am folgenden Tag vor, das Resultat der Silberfärbung in der vorliegenden Arbeit nach etwa 10 Minuten.

Da die direkte Anfärbung der geblotteten Proteine hauptsächlich aus Gründen der Überprüfung des Transfererfolges geschehen wird, wird auch eine eventuelle höhere Empfindlichkeit der Methode nach YUEN et al. den Zeit- und Aufwandsnachteil in der Regel nicht aufwiegen.

4.7. Diffusionsblotting und immunologischer Nachweis der Immunglobuline

1975 beschrieb SOUTHERN eine Methode für den Transport von DNA-Fragmenten auf Nitrocellulose durch Kapillarkräfte. Diese Methode wurde als "Southern Blotting" bekannt. Eine Transfermethode von ALWINE et al. (1977) auf Diazobenzylloxymethyl-Papier (DBM) wurde als "Northern Blotting" bezeichnet. RENART et al. (1979) wandten die Kapillarblottingtechnik an um Proteine von Polyacrylamid-Agarosegelen auf DBM-Papier zu transferieren. Im gleichen Jahr beschrieben TOWBIN et al. (1979) den elektrophoretischen Transfer von Proteinen von Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosefolien. Modifikationen dieser Technik durch BURNETTE (1981) wurden als "Western Blotting" bezeichnet. BOWEN et al. (1980) führten als eine Variante der Kapillarblottingtechnik die Technik des Kontaktdiffusionsblotting ein.

Mehrere Autoren benutzten die Methode des Diffusionsblotting auf Nitrocellulosefolie nach Isoelektrischer Fokussierung (GLYNN et al., 1982; WALKER et al., 1983). In der vorliegenden Arbeit wurde eine von HOFFMAN und JUMP (1985) beschriebene Technik des Diffusionsblotting von Agarosegelen auf Nitrocellulosefolie, bei einigen Modifikationen, angewandt. So wurde ein etwas anderer Puffer verwendet, bei dem auch das hochgiftige Thimerosal, ohne daß sich dieses negativ bemerkbar gemacht hätte, nicht zugemischt wurde. Auch wurde die Transferzeit von 10 Minuten bei HOFFMAN und JUMP auf 1 Stunde erhöht. Dies ist ebenfalls ohne Nachteile möglich, da die auf die Nitrocellulosefolie transferierten Proteine hier nicht mehr auseinanderdiffundieren (BEISIEGEL, 1986). HOFFMAN und JUMP blotteten menschliches IgG und IgM. Sie beschrieben dabei, daß das IgM nur in minimalen

Mengen vom Agarosegel auf die Nitrocellulosefolie transferiert wird (weniger als 2 % auch nach einer Zeit von 45 Minuten). Das Human-IgM hat ein Molekulargewicht von 900000 Dalton (ROITT, 1977) und ist somit dem Hühner-IgM vergleichbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Erfahrung gemacht, daß sehr wohl ein nennenswerter IgM-Transfer vom Agarosegel auf die Nitrocellulosefolie stattfindet. So reicht die transferierte IgM-Menge aus, um eine Unterscheidung der dys- von den agammaglobulinämischen Seren treffen zu können, welche durch den IgG-Nachweis nicht getroffen werden kann.

Dieselbe Feststellung wie für das IgM wurde für das IgA gemacht.

Zusammenfassend kann für die Erfahrungen in der vorliegenden Arbeit mit der Technik des Diffusionsblotting mit anschließender Immunfixation und Färbung, bei Verwendung Peroxidasegekoppelter Antikörper, festgehalten werden:

- a) Die Möglichkeit des Diffusionsblotting zeigt einen weiteren Vorteil der Fokussierung in Agarosegelen, da der notwendige elektrophoretische Transfer von Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosefolie wesentlich aufwendiger und schwieriger durchzuführen ist.
- b) Auch größere Moleküle, wie IgM und IgA, werden in nennenswertem Umfang durch Diffusionsblotting vom Agarosegel auf die Nitrocellulosefolie transferiert.
- c) Gegenüber der direkten Immunofixation im Gel (ALPER and JOHNSON, 1969; RITCHIE and SMITH, 1976; JOHNSON, 1976; ARNAUD et al., 1977) bietet die Immunofixation nach Transfer auf die Nitrocellulosefolie eine höhere Empfindlichkeit und vermeidet das Problem des Auseinanderdiffundierens, wie es im Gel auftritt.

- d) Der immunologische Nachweis der Immunglobuline ist wesentlich empfindlicher als jener mit Hilfe der Coomassiefärbung.
- e) Durch den immunologischen Nachweis von IgG kann schon bei 4 Wochen alten Küken der immunologische Status eindeutig festgestellt werden (intakt, defekt, Übergangsformen), wobei sich der jeweilige Status auch optisch sehr schön darstellt.
- f) Mit dem immunologischen Nachweis von IgA oder IgM kann eine Unterscheidung von dys- und agammaglobulinämischen Hühnern getroffen werden. Diese Unterscheidung ist mit dem IgG-Nachweis nicht möglich.

Abschließend ist festzuhalten, daß in der vorliegenden Arbeit, unter Anwendung der Methode der Isoelektrischen Fokussierung in Agarosegelen, folgende Ergebnisse erzielt werden konnten:

- pI-Bereich von Hühnergesamtserum
- pI-Bereich von IgG, IgM und IgA vom Huhn
- pI-Bereich von Hämoglobin vom Huhn
- Methode des Proteintransfers auf Nitrocellulosefolie mit anschließendem immunologischen Proteinnachweis unter Verwendung Peroxidasegekoppelter Antikörper
- Möglichkeit der Unterscheidung von Hühnerseren unterschiedlicher Provenienz nach ihrem immunologischen Status

So bleibt zum Schluß festzustellen, daß die Methode der Isoelektrischen Fokussierung, verbunden mit der einfachen Methode des Diffusionsblottings auf Nitrocellulosefolie, wie hier am Beispiel der Hühnerserumproteine dargestellt, sicherlich aussichtsreiche Perspektiven für die Untersuchung von Physiologie und Pathologie der Tiere bietet.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Unter Anwendung der Isoelektrischen Fokussierung in Agarosegelen wurden Serumproteine des Haushuhnes, bei besonderer Berücksichtigung immunologischer Aspekte, untersucht.

Aus den Coomassie- oder Silbergefärbten Proteinphorogrammen von LSL-Seren, normo-, dys- und agammaglobulinämischen Seren (4 bzw. 6 Monate alter Hühner) ergibt sich:

- Die Serumproteinbanden liegen im pH-Bereich 2,8-8,0.
- Das Proteinmuster von LSL- und normogammaglobulinämischen UM-B19-Seren stimmt überein.
- Bei den Seren von agammaglobulinämischen und dysgammaglobulinämischen Hühnern ist eine deutliche Abnahme der Bandenintensität im Bereich größer pH 5,5 zu erkennen.
- Seren dys- und agammaglobulinämischer Hühner lassen sich nicht unterscheiden.
- Seren immunologisch intakter und defekter Hühner lassen sich unterscheiden.

Coomassiegefärbte Pherogramme von Hühnerhämoglobin zeigen 8 stärkere Banden im pH-Bereich 7,0-8,0, wobei die Hauptbande bei pH 7,8 zu finden ist.

Die Pherogramme der Immunglobuline des Huhnes ergeben:

- IgG: mindestens 41 Banden im pH-Bereich 5,5-7,2
- IgM: mindestens 10 Banden im pH-Bereich 4,0-5,8
- IgA: mindestens 10 Banden im pH-Bereich 3,0-5,6

Nach Isoelektrischer Fokussierung in Agarosegelen wurden die aufgetrennten Proteine mittels Diffusions-

blotting auf Nitrocellulosefolie übertragen und hier immunologisch untersucht. Dabei wird gefunden:

- Übereinstimmung der immunologisch nachgewiesenen Immunglobuline mit dem Coomassiegefärbten Immunglobulinmuster.
- Mit dem Nachweis von IgG können die Seren auch im Alter von 4 Wochen eindeutig in immunologisch defekt oder immunologisch intakt unterschieden werden.
- Mit dem Nachweis auf IgM oder IgA können dys- von agammaglobulinämischen Hühnerseren unterschieden werden.

Insgesamt ist festzustellen, daß die Isoelektrische Fokussierung in Agarosegelen, vor allem in Verbindung mit dem technisch einfachen Transfer auf Nitrocellulosefolie, eine hervorragende Methode, insbesondere für immunologische Untersuchungen, darstellt.

6. SUMMARY

Isoelectric Focusing of Chicken Serum Proteins in Agarose Gels.

Using the isoelectric focusing in agarose gels, serum proteins of the chicken were examined considering immunological aspects.

From the coomassie- or silver stained proteinphorograms of LSL, normo-, dys- and agammaglobulinemic serums (4 respectively 6 months old chickens) results the following:

- The serum protein bands are at 2,8-8,0 in the pH-sector.
- The protein pattern of LSL- and normogammaglobulinemic UM-B19 serums corresponds.
- The serums of agammaglobulinemic and dysgammaglobulinemic chickens show a distinct decrease of band intensity in the sector of more than 5,5 pH.
- Serums of dys- and agammaglobulinemic chickens cannot be distinguished.
- Serums of immunological intact and defective chickens can be distinguished.

Coomassie stained pherograms of chicken hemoglobin show 8 stronger bands in the pH-sector 7,0-8,0, whereas the main band lies at pH 7,8.

The pherograms of the immunoglobulins of the chicken result in:

- IgG: at least 41 bands in the pH-sector 5,5-7,2
- IgM: at least 10 bands in the pH-sector 4,0-5,8
- IgA: at least 10 bands in the pH-sector 3,0-5,6

After isoelectric focusing in agarose gels the separated proteins were transmitted to nitrocellulose sheets by diffusion blotting and immunologically examined.

Thereby, following was stated:

- Conformity of the immunological proved immunoglobulins with the coomassie stained immunoglobulin pattern.
- With the evidence of IgG the serums can be distinguished also at the age of 4 weeks in clearly immunological defective or immunological intact.
- With the evidence of IgM or IgA the dysgammaglobulinemic serums can be distinguished from the agammaglobulinemic.

As a whole the isoelectric focusing in agarose gels, above all in connection with the technically simple transfer to nitrocellulose sheets, presents an excellent method, above all for immunological analyses.

7. LITERATUR

ALBANESE, A.A.

An Electrolytic Method for the Determination of the Basic Amino Acids in Proteins.

J. Biol. Chem. 134, 467 (1940)

ALLEN, R.C., SARAVIS, C.A. and MAURER, H.R.

Gel Electrophoresis and Isoelectric Focusing of Proteins. Selected Techniques.

Walter de Gruyter. Berlin-New York (1984)

ALPER, C.A. and JOHNSON, A.M.

Immunofixation electrophoresis: A technique for the study of protein polymorphism.

Vox Sang. 17, 445 (1969)

ALWINE, J.C., KEMP, D.J. and STARK, G.R.

Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzylmethyl-paper and hybridization with DNA probes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5350 (1977)

ARNAUD, P., WILSON, G.B., KOISTINEN, J. and FUDENBERG, H.H.

Immunofixation after electrofocusing: Improved method for specific detection of serum proteins with determination of isoelectric points.

I. Immunofixation print technique for detection of alpha-1-protease inhibitor.

J. Immunol. Meth. 16, 221 (1977)

BANERJEE, S. and BANDYOPADHYAY, A.

Dietary fat and serum proteins in chickens.

Ind. J. Exp. Biolog. 13, 297 (1975)

BEISIEGEL, U.

Protein blotting.

Electrophoresis 7, 1 (1986)

BLACK, J.A.

A silver stain for isoelectric focusing in agarose gel and its application for analyzing unconcentrated cerebrospinal fluid.

Electrophoresis 6, 27 (1985)

BOURS, J.

Isoelectric Focusing and Immunochemistry of Lens Crystallins.

Doc. Ophthalmol. 37, 1 (1974)

BOWEN, B., STEINBERG, J., LAEMMLI, U.K. and WEINTRAUB, H.

The detection of DNA-binding proteins by protein blotting.

Nucl. Acids Res. 8, 1 (1980)

BRÜGGEMANN, J., MERKENSCHLAGER, M., KIRCHNER, B. and LÖSCH, U.

Eine erbliche Hypo- bzw. Dysgammaglobulinämie beim Haushuhn.

Naturwissenschaften 54, 97 (1967)

BRÜGGEMANN, J., FRIEDRICH, B. and LÖSCH, U.

Vergleichende Bestimmungen der Immunglobulinspiegel genuin dysgammaglobulinämischer und "hormonell bursektomierter" Hühner.

Z. Tierphysiol., Futterm. 24, 317 (1969)

BRÜGGEMANN, J., FRIEDRICH, B., LÖSCH, U. and SCHMID, D.O.

Zur Antikörperproduktion dysgammaglobulinämischer Hühner. I. Isohämagglutinine.

Z. Immun. Forsch. 141, 280 (1971)

BURNETTE, W.N.

"Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A.

Anal. Biochem. 112, 195 (1981)

COX, G.J., KING, H. and BERG, C.P.

The Preparation of Lysine, Histidine, and Arginine from Hydrolyzed Blood Corpuscle Paste by Electrical Transport.

J. Biol. Chem. 81, 755 (1929)

COOK, R. and SARAIVIS, C.A.

Marine Colloids Instruction Leaflet (1979)

DU VIGNEAUD, V., IRVING, G.W., DYER, H.M. and SEALOCK, R.R.

Electrophoresis of Posterior Pituitary Gland Preparations.

J. Biol. Chem. 123, 45 (1938)

ENGVALL, E. and PERIMANN, P.

Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA
III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes.

J. Immunol. 109, 129 (1971)

FIEDLER, H., LÖSCH, U., HERLYN, D. and HOFFMANN-FEZER, G.

Die Auswirkungen neonataler Cyclophosphamidverabreichung (Cy), chirurgischer Bursektomie (BX) und kombinierter Behandlung (Cy + BX) auf die immunologische Leistungsfähigkeit von Küken in verschiedenen Altersstufen.

Zbl. Vet. Med. B 24, 609 (1977)

FIEDLER, H., LÖSCH, U. and HALA, K.

Establishment of a B-compatible chicken line with normogammaglobulinemia and dysgammaglobulinemia.
Folia biologica (Praha) 26, 17 (1980)

FIEDLER, H., SCHEU, M., KÜHLMANN-RABENS, I. and LÖSCH, U.

Kinetics on the DTH-reaction and Ig levels in FCA-injected dysgammaglobulinemic B12 chickens.
Immunobiol. 158, 293 (1981)

FOSTER, G. L. and SCHMIDT, C. L. A.

The Separation of the Dicarboxylic Amino Acids from Certain Protein Hydrolysates by Electrical Transport.

J. Am. Chem. Soc. 48, 1709 (1926)

GLICK, B. and SADLER, C. R.

The elimination of the Bursa of Fabricius and reduction of antibody production in birds from eggs dipped in hormone solution.

Poultry Science 40, 185 (1961)

GLYNN, P., GILBERT, H., NEWCOMBE, J. and CUZNER, M. L.

Rapid analysis of immunoglobulin isoelectric focusing patterns with cellulose nitrate sheets and immunoperoxidase staining.

J. Immunol. Meth. 51, 251 (1982)

GÖRG, A., POSTEL, W. and WESTERMEIER, R.

Einfache Herstellung von Polyacrylamidgel-Folien für die isoelektrische Fokussierung.

Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 164, 160 (1977)

GRIM, M., CHRIST, B., JACOB, H.J., KULICH, J. and PARIZEK, J.
Isoelectrically focused carboxyesterases as a
biological marker in chimeras.
Experientia 40, 1142 (1984)

HATTORI, M. and WAKABAYASHI, K.
Isoelectric focusing and gel filtration studies
on the heterogeneity of avian pituitary lutein-
izing hormone.
Gen. Comp. Endocrinol. 39, 215 (1979)

HAWKES, R., NIDAY, E. and GORDON, J.
A Dot-Immunobinding Assay for Monoclonal and
Other Antibodies.
Anal. Biochem. 119, 142 (1982)

HERLYN, D., BOHNER, J. and LÖSCH, U.
IgG turnover in dysgammaglobulinemic chickens.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1169 (1977)

HOFFMAN, W.L. and JUMP, A.A.
Rapid Blotting of IgG to Nitrocellulose with
Minimal IgM Contamination.
J. Immunol. Meth. 76, 263 (1985)

HOFFMANN-FEZER, G., LÖSCH, U., HOFFMANN, R. and SCHMAHL, W.
Verminderung oberflächengebundener Immunglobuline
auf Lymphozyten genuin dysgammaglobulinämischer
Küken.
Z. Immun. Forsch. 147, 61 (1974)

HOFFMANN-FEZER, G. and LÖSCH, U.
Distribution of IgM-, IgG- and IgA-positive cells
in lymphatic organs of normo- and dysgammaglobu-
linemic UM-B19 chickens.
Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 70, 346 (1983)

IKEDA, K. and SUZUKI, S.

U.S. Patent 1,015,891 (1912)

JAY, D.G.

Characterisation of the Chicken Erythrocyte Anion Exchange Protein.

J. Biol. Chem. 258, 9431 (1983)

JOHNSON, A.M.

Genetic typing of α_1 -antitrypsin by immunofixation electrophoresis. Identification of subtypes of Pi M.

J. Lab. Clin. Med. 87, 152 (1976)

KÄHLKE, M.

Elektrophoretische Untersuchungen über die Zusammensetzung der Serumeiweißfraktionen gesunder und mit Salmonella gallinarum pullorum infizierter Hühner mit dem Mikroelektrophoresegerät nach Antweder.

Vet. Med. Diss., Gießen (1961)

KAI, C., YOSHIKAWA, Y., YAMANOUCI, K. and OKADA, H.

Isolation and Identification of the Third Component of Complement of Japanese Quails.

J. Immunol. 130, 2814 (1983)

KERENYI, L. and GALLYAS, F.

A highly sensitive method for demonstrating proteins in electrophoretic, immunoelectrophoretic and immunodiffusion preparations.

Clin. Chim. Acta 38, 465 (1972)

KOBAYASHI, K. and HIRAI, H.

Studies on subunit components of chicken polymeric immunoglobulins.

J. Immunol. 124, 1695 (1980)

KOCH, C., SKJODT, K. and LAURSEN, I.

A Simple Immunoblotting Method after Separation of Proteins in Agarose Gel.

J. Immunol. Meth. 84, 271 (1985)

KOLIN, A.

Separation and Concentration of Proteins in a pH Field Combined with an Electric Field.

J. Chem. Phys. 22, 1628 (1954)

KOLIN, A.

Electrophoretic "Line Spectra".

J. Chem. Phys. 23, 407 (1955a)

KOLIN, A.

Isoelectric Spectra and Mobility Spectra: A New Approach to Electrophoretic Separation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 41, 101 (1955b)

KOLIN, A.

Rapid Electrophoresis in Density Gradients Combined with pH and/or Conductivity Gradients.

In: Methods of Biochemical Analysis;

Glick, D. ed. (Interscience Publishers, Inc., New York), 6, 259 (1958)

KOLIN, A.

IV. pH Gradient Electrophoresis.

In: Methods in Medical Research;

Olson, R.E., ed. (Year Book Med. Publ. Inc., Chicago), 12, 326 (1970)

LEE, K.S., HUANG, P.C. and COHEN, B.H.

Further Resolution of Adult Chick Hemoglobins by Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel.

Biochim. Biophys. Acta 427, 178 (1976)

LESLIE, G.A. and CLEM, L.W.

Phylogeny of the immunoglobulin structure and function. III. The immunoglobulins of the chickens. J. Exp. Med. 130, 1337 (1969)

LESLIE, G.A. and MARTIN, L.N.

Studies on the secretory immunologic system of fowl. III. Serum and secretory IgA of the chicken. J. Immunol. 110, 1 (1973)

LOEKEN, M.R. and ROTH, T.F.

Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte. Immunology 49, 21 (1983)

LÖSCH, U.

Zur Charakterisierung einer erblichen Dysgammaglobulinämie. Habilitationsschrift, München (1972)

LÖSCH, U., HARTMANN, W. and RIEDEL, G.

Zur Antikörperproduktion dysgammaglobulinämischer Hühner. II. Präzipitierende Antikörper (Anti-HSA). Z. Immun. Forsch. 143, 16 (1972)

LÖSCH, U. and HOFFMANN-FEZER, G.

Vergleichende histologische und immunologische Untersuchungen an immunologisch defekten Hühnern. II. Genuin dysgammaglobulinämische Hühner. Zbl. Vet. Med. A 20, 596 (1973)

LÖSCH, U., KÜHLMANN, I., KLUMPNER, W. and FIEDLER, H.

Course of serum-Ig concentration in B12 chickens of the UM-B19-line. Immunobiology 158, 416 (1981)

LÖSCH, U., WANKE, R. and MERKENSCHLAGER, M.

Antikörperisotypen nach Immunisierung genuin dys-
gammaglobulinämischer UM-B19 Hühner.

Zbl. Vet. Med. A 29, 365 (1982)

MANCINI, G., CARBONARA, O. and HEREMANS, J.F.

Immunochemical quantitation of antigens by single
radial immunodiffusion.

Immunochem. 2, 235 (1965)

MERKENSCHLAGER, M., RIEDEL, G., KIRCHNER, B. and LÖSCH, U.

Die Immunglobuline bursektomierter Küken in der
Immunoelektrophorese.

Naturwissenschaften 53, 408 (1966)

MEYERS, P. and QUALTIERE, L.F.

The efficiency of chemical bursectomy in chickens
with congenital leucosisvirus infection.

Immunol. 31, 527 (1976)

MISHIMA, N. and IKEDA, A.

Isoelectric Focusing Studies on Immunochemical
Change with Age in Chicken Lens Crystallin.

Kawasaki Med. J. 9, 219 (1983)

MOO-PENN, W.F. and SCHMIDT, R.M.

Recommendations for Abnormal Haemoglobin Standard.

Brit. J. Haematol. 35, 161 (1977)

N.N.

Isoelectric Focusing. Principles & Methods.

Pharmacia Fine Chemicals. (1982)

OBERDORFER, A.

Zur Regulation der Proteinbiosynthese durch Sexualhormone: Die Wirkungen von Oestradiolbenzoat und von Testosteronpropionat auf die Konzentration von Serumproteinen.

Acta endocrinologica, Suppl. 143, 64 (1970)

OBERDORFER, A. and LÖSCH, U.

Das sedimentationsanalytische Serumeiweißbild dysgammaglobulinämischer Hühner.

Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1007 (1970)

OBERTHÜR, W., BRAUNITZER, G., SCHNEEGANSS, D., BAUER, H. and KÖSTERS, J.

Vergleichende Untersuchungen am Hämoglobin verschiedener Hühnerrassen.

IV. Tagung der Fachgruppe "Geflügelkrankheiten".

Thema: Vogelkrankheiten.

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., 191 (1985)

PHILLIPS, M., PATTERSON, R.E., PATTERSON, J.M. and STONE, S.S.

Comparison of Methods for Separating Proteins Using Bisalbuminemia as a Model.

Prep. Biochem. 6, 265 (1976)

RENART, J., REISER, J. and STARK, G.R.

Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3116 (1979)

RIETSCHEL,G., SENFT,B. and RIETSCHEL,W.

Vergleichende Untersuchungen an Serumproteinen
von Fasanen, Hühnern und deren Hybriden.

Arch. Geflkd. 40, 89 (1976)

RIGHETTI,P.G., BROST,B.C.W. and SNYDER,R.S.

On the Limiting Pore Size of Hydrophilic Gels for
Electrophoresis and Isoelectric Focusing.

J. Biochem. Biophys. Methods 4, 347 (1981)

RIGHETTI,P.G.

Isoelectric focusing: theory, methodology and
applications.

Elsevier Biomedical Press. Amsterdam-New York-
Oxford (1983)

RITCHIE,R.F. and SMITH,R.

Immunofixation. I. General Principles and Appli-
cation to Agarose Gel Electrophoresis.

Clin. Chem. 22, 497 (1976)

ROITT,I.M.

Leitfaden der Immunologie.

Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt (1977)

ROSEN,A., EK,K. and AMAN,P.

Agarose isoelectric focusing of native human
immunoglobulin M and α_2 -macroglobulin.

J. Immunol. Meth. 28, 1 (1979a)

ROSEN,A., EK,K., AMAN,P. and VESTERBERG,O.

Agarose Isoelectric Focusing of Macroproteins.

Prot. Biol. Fluids 27, 707 (1979b)

ROSEN, A.

Agarose Isoelectric Focusing of Monoclonal IgM
and IgG Antibodies.

In: Electrophoresis '79;

Radola, B.J. ed. (de Gruyter, Berlin), 105 (1980)

SARAVIS, C.A. and ZAMCHECK, N.

Isoelectric Focusing in Agarose.

J. Immunol. Meth. 29, 91 (1979)

SARAVIS, C.A., O'BRIEN, M. and ZAMCHECK, N.

Direct Tissue Isoelectric Focusing in Agarose.

J. Immunol. Meth. 29, 97 (1979)

SARAVIS, C.A., CANTAROW, W., MARASCO, P.V., BURKE, B. and
ZAMCHECK, N.

Amplified immunoperoxidase staining of isoelectri-
cally focused human tumor markers.

Electrophoresis 1, 191 (1980a)

SARAVIS, C.A., CUNNINGHAM, C.G., MARASCO, P.V., COOK, R.B.
and ZAMCHECK, N.

Immunoperoxidase Staining and Radioimmunobinding
of Human Tumor Markers Separated by Direct Tissue
Agarose Isoelectric Focusing.

In: Electrophoresis '79;

Radola, B.J. ed. (de Gruyter, Berlin), 117 (1980b)

SCHELLNER, H.P.

Bestimmung des qualitativen und quantitativen
Serumeiweißgehaltes des Huhnes, vom Schlupf bis
zur 30. Lebenswoche.

Arch. Geflkd. 3, 128 (1971)

SCHRANNER, I., LÖSCH, U. and MERKENSCHLAGER, M.

Das Serumproteinmuster des Haushuhns. Vergleichende Darstellung der Serumproteine normaler und defekter Hühner.

Zbl. Vet. Med. A 29, 327 (1982)

SCHRANNER, I. and LÖSCH, U.

Immunological Identification of Avian Monomeric and Polymeric Immunoglobulin M and Immunoglobulin A after Fractionation on Sodium Dodecylsulfate Pore Gradient Polyacrylamide Gels.

Poultry Science 65, 360 (1986)

SORKINA, D.A. and BOODINA, N.I.

Structural characteristics of serum albumin from heterotic hen hybrids according to isoelectric focusing data.

Zh. Evol. Biokhim. Fiziol. 16, 346 (1980)

SOUTHERN, E.M.

Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis.

J. Mol. Biol. 98, 503 (1975)

SPERBER, E.

Electrolytic Separation of Basic, Neutral, and Acidic Amino Acids in Protein Hydrolysates.

J. Biol. Chem. 166, 75 (1946)

SPIES, J.R., BERNTON, H.S. and STEVENS, H.

The Chemistry of Allergens. IV. An Electrophoretic Fractionation of the Protein-Polysaccharide Fraction, CS-1A, from Cottonseed.

J. Am. Chem. Soc. 63, 2163 (1941)

SVENSSON, H.

Isoelectric Fractionation, Analysis, and Characterization of Ampholytes in Natural pH Gradients.

I. The Differential Equation of Solute Concentrations at a Steady State and its Solution for Simple Cases. Acta Chem. Scand. 15, 325 (1961)

SVENSSON, H.

Isoelectric Fractionation, Analysis, and Characterization of Ampholytes in Natural pH Gradients.

II. Buffering Capacity and Conductance of Isoionic Ampholytes.

Acta Chem. Scand. 16, 456 (1962a)

SVENSSON, H.

Isoelectric Fractionation, Analysis, and Characterization of Ampholytes in Natural pH Gradients.

III. Description of Apparatus for Electrolysis in Columns Stabilized by Density Gradients and Direct Determination of Isoelectric Points.

Arch. Biochem. Biophys., Suppl. 1, 132 (1962b)

TEGELSTROEM, H., WYOENI, P.I. and RYTTMAN, H.

Thin layer isoelectric focusing as a tool for higher category systematics.

Ann. Zool. Fenn. 19, 203 (1982)

TENENHOUSE, H.S. and DEUTSCH, H.F.

Some Physical-chemical Properties of Chicken γ -Globulins and their Pepsin and Papain Digestion Products.

Immunochem. 3, 11 (1966)

THEORELL, H. and ÅKESSON, A.

Studies on Cytochrome c. I. Electrophoretic Purification of Cytochrome c and its Amino Acid Composition.

J. Am. Chem. Soc. 63, 1804 (1941)

TISELIUS, A.

Stationary electrolysis of ampholyte solutions.

Svensk Kem. Tidskr. 53, 305 (1941)

TOWBIN, H., STAEGELIN, T. and GORDON, J.

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350 (1979)

UEBEL, I.

Untersuchungen zur Veränderung von Struktur und Aktivität der Immunglobuline des Huhnes nach Inkubation des Serums mit 2-Mercaptoäthanol.

Vet. Med. Diss., München (1984)

VESTERBERG, O.

Synthesis and Isoelectric Fractionation of Carrier Ampholytes.

Acta Chem. Scand. 23, 2653 (1969)

VESTERBERG, O. and GRAMSTRUP-CHRISTENSEN, B.

Sensitive silver staining of proteins after isoelectric focusing in agarose gels.

Electrophoresis 5, 282 (1984)

WALKER, R.W.H., KEIR, G., JOHNSON, M.H. and THOMPSON, E.J.

A Rapid Method for Detecting Oligoclonal IgG in Unconcentrated CSF, by Agarose Isoelectric Focusing, Transfer to Cellulose Nitrate and Immunoperoxidase Staining.

J. Neuroimmunol. 4, 141 (1983)

WEIDANZ, W.P., WEBER, W.T. and MAQUIRE, H.C.

Allergic contact dermatitis in the B-cell deficient chicken.

Int. Arch. Allergy 50, 755 (1976)

WILLIAMS, R.J.

Fractional Electrical Transport as a Tool in Biochemical Research.

J. Biol. Chem. 110, 589 (1935)

WILLIAMS, R.R. and WATERMAN, R.E.

Electrodialysis as a Means of Characterizing Ampholytes.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 27, 56 (1929)

WILLIAMS, R.R. and TRUESDAIL, J.M.

The Use of Fractional Electrolysis in the Fractionation of the "Bios" of Wildiers.

J. Am. Chem. Soc. 53, 4171 (1931)

WILLOUGHBY, E.W. and LAMBERT, A.

A Sensitive Silver Stain for Proteins in Agarose Gels.

Anal. Biochem. 130, 353 (1983)

WINKLER, M.A. and SANDERS, B.G.

Chemical and Immunologic Characterization of a β_2 -Microglobulin-like Protein Isolated from Chicken Sera.

Immunochem. 14, 615 (1977)

YUEN, K.C.L., JOHNSON, T.K., DENELL, R.E. and CONSIGLI, R.A.

A Silver-Staining Technique for Detecting Minute Quantities of Proteins on Nitrocellulose Paper: Retention of Antigenicity of Stained Proteins.

Anal. Biochem. 126, 398 (1982)

ZARETSKII, I.Z., PETUKHOVA, M.B. and ERSHOV, F.I.

Study of chicken and mouse interferons by isoelectrofocusing.

Byull. Eksp. Biol. Med. 86, 184 (1978)

Herrn Prof. Dr. U. Lösch danke ich für die Überlassung des Themas und für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. I. Schraner, die mich mit steter Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit unterstützte.

Tabellarischer Lebenslauf

Name: Rudi Nielazne

Geburtstag,
Geburtsort: 07.12.52 in Püchersreuth

Familienstand: verheiratet seit 1980, 1 Kind

Schulbildung: 4 Jahre Volksschule
9 Jahre Gymnasium - Abitur

Wehrdienst: 1972-1973

1. Studium: WS 1973/74 - SS 1978 Dipl.-Ing. für
Lebensmitteltechnologie an der
TU München-Weihenstephan

Berufstätigkeit: 1978-1982 in verschiedenen Tätig-
keitsbereichen

2. Studium: ab WS 1982/83 Tiermedizin an der
LMU München; Staatsexamen 21.12.87;
Approbation 04.02.88

